Série A, N°
N° d'ordre : 942

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR-INGÉNIEUR

PAR

Mongi JEMMALI

1re THÈSE

« SUR LE COMPORTEMENT DE DEUX TYPES DE MICROORGANISMES ET DE DIFFÉRENTS ENZYMES EN PRÉSENCE DE PRODUITS DE LA RÉACTION DE MAILLARD. »

2e THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 6 mai 1965 devant la Commission d'examen :

MM CHOUARD — *Président.*
DUBERT, DEDONDER — *Examinateurs.*

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle, Paris-7e

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546825_0055

Série A, N°
N° d'ordre : 942

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE TITRE DE DOCTEUR-INGÉNIEUR

PAR

Mongi JEMMALI

1re THÈSE

« SUR LE COMPORTEMENT DE DEUX TYPES DE MICROORGANISMES ET DE DIFFÉRENTS ENZYMES EN PRÉSENCE DE PRODUITS DE LA RÉACTION DE MAILLARD. »

2e THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 6 mai 1965 devant la Commission d'examen :

MM CHOUARD — *Président.*
DUBERT, DEDONDER — *Examinateurs.*

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE
149, rue de Grenelle, Paris-7e

UNIVERSITEITSBIBLIOTHEEK - LEIDEN -

FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen..... M. ZAMANSKY

BRELOT	T	Analyse supérieure.
PRENANT	T	Anatomie et histologie comparée.
GRASSE	T	Évolution des êtres organisés.
PRÉVOST	T	Chimie organique.
WYART	T	Minéralog. et cristallog.
TEISSIER	T	Zoologie.
MANGENOT	T	Biologie végétale (Orsay).
AUGER	T	Physique quantique et relativité.
MONNIER	T	Physiologie générale.
PIVETEAU	T	Paléontologie.
ROCARD	T	Physique ENS.
CARTAN	T	Mathématiques ENS.
LAFFITTE	T	Chimie générale.
N	T	Géométrie supérieure.
COULOMB	T	Physique du globe.
Mlle COUSIN	T	Biologie animale SPCN.
CHRÉTIEN	T	Chimie minérale.
BOCQUET	T	Zoologie.
KASTLER	T	Physique ENS.
EPHRUSSI	T	Génétique.
RIVIÈRE.....	T	Géologie SPCN et sédiment. (Orsay).
GAUTHERET.....	T	Biologie végétale PCB.
LUCAS R.	T	Recherches physiques.
THOMAS A.	T	Biologie cellulaire.
ARNULF	T	Optique appliquée.
MORAND	T	Physique enseignement.
SOLEILLET	T	Physique PCB.
FORTIER	T	Mécanique exp. des fluides.
DRACH	T	Zoologie.
QUENEY.....	T	Météo et dynamique atmos.
GALLIEN	T	Embryologie.
EICHORN	T	Botanique.
DE CUGNAC	T	Biologie végétale SPCN.
Mlle CAUCHOIS	T	Chimie physique.
THELLIER	T	Physique du globe.
L'HÉRITIER.....	T	Biologie générale (Orsay).
GRIVET	T	Radioélectricité (Orsay).
PONCIN	T	Mécanique générale.
DU BREIL	T	Arith. et théor. des nombres
QUELET.....	T	Chimie organique.
CAGNIARD	T	Géophysique appliquée.
CHAMPETIER	T	Chimie macromoléculaire.
CUVILLIER	T	Micropaléontologie.
JUNG	T	Géologie.
TRILLAT.....	T	Microscopie et diffrac. élec.
WIEMANN	T	Chimie organ. et structur.
JACQUINOT	T	Spectroscopie et physique céleste (Orsay).
VASSY	T	Physique de l'atmosphère.
DESTOUCHES	T	Théorie physique.
AMIEL	T	Chimie générale.
HOCART	T	Minéral. et cristal.
MATHIEU J.-P.	T	Physique optique.
COUTEAUX.....	T	Cytologie.
MAY	T	Zoologie.
CHOQUET	T	Théorie des fonctions et topologie.
FELDMANN	T	Biologie végétale marine.
GUINIER	T	Physique des solides (Orsay).
JOST	T	Physiologie comparée.
FORTET	T	Calcul des probabilités et physique mathématique.
SCHWARTZ	T	Calcul dif. et Intégral.
CHOUARD	T	Physiologie végétale.
MALAVARD	T	Aviation (techn. aéron.).
NORMANT	T	Synthèse organique.
BÉNARD	T	Chimie minérale.
BUVAT	T	Botanique ENS.
DUGUÉ.....	T	Statistique mathématique.
SOULAIRAC	T	Psychophysiologie.
ULRICH	T	Physiologie vég. appli.
MARÉCHAL.....	T	Optique théo. et appli.
KIRRMANN	T	Théories chimiques.
CHADEFAUD	T	Botanique.
Mlle LE BRETON .	T	Physiol. de la nutrition.
LELONG	T	Appli. de l'ana. à la géom.
DEVILLERS	T	Anatomie et histo. compa.
EHRESMANN	T	Topologie algébrique.
FRANCON	T	Physique SPCN.
GLANGEAUD	T	Géogr. phys. et géol.
DODEMENT	T	Mathématiques MGP.
PISOT	T	Technique math. de la phys.
ROCH	T	Géologie.
SCHATZMANN	T	Astrophysique.
TERMIER	T	Géologie générale.
ZAMANSKY.....	T	Mathématiques générales.
LENNUIER	T	Physique MGP.
RIZET	T	Génétique (Orsay).
ROUTHIER	T	Géologie appliquée.
Mme TONNELAT...	T	Physique théorique.
DIXMIER	T	Mathématiques MPC.
SOUCHAY	T	Chimie générale.
AIGRAIN.....	T	Électrotechn. gén.
BRUSSET	T	Chimie systématique.
M. LÉVY	T	Physique théorique des hautes énergies (Orsay).
Mme CHAIX	T	Chimie biologique.
Mme HUREL-PY...	T	Biologie végétale PCB.
PANNETIER	T	Chimie générale.
BRUN	T	Mécaniques des fluides I.
LEDERER	T	Chimie biologique (Orsay).
Mme DUBREIL	T	Mathématiques (agréga.).
Mme LELONG	T	Math. II ENS.
BELLAIR.....	T	Géologie SPCN.
COTTE	T	Physique électricité.
DUBOIS J. E.....	T	Chimie organique.
LAMOTTE	T	Zoologie ENS.
MICHEL A	T	Chimie minérale (Orsay).
OLMER	T	Énergétique générale.
ROUAULT.....	T	Électricité (Orsay).
GAUTHIER	T	Mécanique appliquée.
BARCHEWITZ	T	Chimie physique.
BROSSEL	T	Physique atomique.
BUSER	T	Physiologie comparée.
CAMUS	T	Physiol. végét.
CASTAING.....	T	Physique II thermo (Orsay).
CURIEN	T	Minéral. et cristal.
MOYSE	T	Physiol. végét. (Orsay).
Mme CHARNIAUX-COTTON	T	Évolution des êtres organisés.
POSSOMPES	T	Zoologie.
PULLMANN	T	Chimie quantique.
TEILLAC.....	T	Physique nucl. et radioactivité (Orsay).
TONNELAT	T	Biol. phys. chim. (Orsay).
VILLE	T	Économétrie.
WILLEMART.....	T	Chimie PCB.
DODE	T	Chimie (Orsay).
FREYMANN.....	T	Recherches physiques.
GUINOCHET	T	Biol. vég. SPCN (Orsay).
ROLLET	T	Chimie minérale.
Mlle JOSIEN	T	Chimie SPCN.
CHEVALLEY	T	Géométrie algébrique et théorie des groupes.
ARNOULT	T	Électronique (Orsay).
CHAPELLE	T	Physique I (Orsay).
DELANGE	T	Mathématiques I (Orsay).
DENY	T	Mathém. gén. (Orsay).
GERMAIN	T	Mécanique théorique des fluides.
LUCAS	T	Géologie.
ALLARD	T	Chimie physique.
BERTHELOT	T	Physique des particules fondamentales (Orsay).
BRICARD	T	Météor. et phys. de l'atmos.
Mme ALBE-FESSARD	T	Psycho. physio.
FRIEDEL	T	Physique des solides (Orsay).
M. JULIA.....	T	Études des moléculaires complexes.
LENDER	T	Biologie animale SPCN (Orsay).
MAGAT	T	Physico-chimie des radio-éléments.
Mlle QUINTIN	T	Électrochimie.
MONOD.....	T	Chimie du métabolisme.
BENOIT	T	Physiol. animale (Orsay).
DE POSSEL	T	Analyse numérique.

CHARLOT	T	Chimie analytique.
LEMÉE	T	Écologie végétale (Orsay).
GUÉRIN	T	Chimie MGP (Orsay).
CHATELET	T	Chimie PCB.
JEAN	T	Physio. nucléaire (Orsay).
MATTLER	T	Physique SPCN.
BERGERARD	T	Zoologie (Orsay).
BERTEIN	T	Électronique (Orsay).
BOUISSIÈRES	T	Radiochimie.
Mme COUTURE	T	Therm. et mécan. physique.
ELLEMBERGER	T	Géologie des grandes régions du globe (Orsay).
FRANC	T	Biologie animale PBC.
SCHNELL		Botanique tropicale.
ZTLOKOWSKI	T	Physiologie végétale.
ACHER	T	Chimie biologique.
BAUDOIN	T	Biologie animale PCB.
BEAUMONT		Biologie animale SPCN.
BLAMONT	T	Géophysique ionosphère.
BOUREAU	T	Botanique.
CURIE D		Physique MGP.
DURAND-DELGA	T	Géologie.
FRÉON	T	Chimie organique (Orsay).
HELLER	T	Physiologie végétale.
TORTRAT	T	Calcul des probabilités.
CAILLEUX	T	Géologie SPCN.
MAGNAN		Physique électricité.
MAUDEL	T	Mécanique ondulatoire appliquée à la chimie théor. et la phys. nucléaire.
Mlle FOURCROY		Biologie végétale SPCN.
Mme CHOQUET-BRUHAT	T	Mécanique analytique et mécan. céleste.
Mlle VEIL	T	Physiologie générale.
LWOFF	T	Microbiologie.
SIESTRUNCK	T	Mécan. phys. et expérimentale.
LACOMBE	T	Métallurgie des métaux nucléaires (Orsay).
BROCHARD	T	Physique PCB (Orsay).
CABANNES	T	Mécanique générale.
LESIEUR	T	Math. I (Orsay).
MAZET	T	Mécan. gén. (Orsay).
CAIRE		Géographysique et géodynamique.
COMOLET		Mécan. des fluides.
CORABŒUF	T	Physiol. animale (Orsay).
DELLOUE	T	Physique de l'exosphère.
GORENFLOT		Botanique II (Orsay).
HOUILLON		Biologie animale PCB.
JULLIEN J.		Chimie SPCN (Orsay).
MALGRANGE	T	Technique mathém. de la phys. (Orsay).
OLIVIER		Antropologie.
NOZERAN	T	Botanique II (Orsay).
BLANC-LAPIERRE	T	Physique ENS (Orsay).
CHEVAUGEON	T	Botanique (Orsay).
KAHANE	T	Mathématiques (Orsay).
SAMUEL	T	Math. ENS féminines.
KOURGANOFF	T	Astronomie (Orsay).
THIRY	T	Mécan. céleste.
ABELES		Physique SPCN.
AMAT	T	Physique PCB.
AUBOIN	T	Géologie.
Mme BENOIT GUEUTAL	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay).
BOUGIS		Biol. marine (Villefranche-sur-mer).
BRUHAT	T	Math. PMC.
BRUNN	T	Géologie historique (Orsay).
CHABBAL	T	Physique MGP (Orsay).
DEHEUVELS	T	Math. propéd.
D'ESPAGNAT	T	Physique théorique (Orsay).
FURON	T	Géologie SPCN.
Mme GANS	T	Génétique.
GENÈVES		Biologie végétale PCB.
GUILBERT		Physique GUS (Orléans).
HUPE	T	Pétrographie.
HOLLANDE	T	Biolo. gén.
LIONS	T	Analyse numérique.
MAITTE	T	Chimie PCB.
MEYER		Physique propé.
NICOLAS		Géologie appliquée.
PANIGEL		Biologie générale.
RAVIER		Pétrographie.
ROSEAU	T	Mécan. théorique des fluides.
ROUBINE		Électronique.
SILBER	T	Chimie PCB.
UEBERSFELD	T	Électronique.
YVON	T	Théories physiques.
HERVÉ	T	Mathématiques.
NÉRON	T	Math. MPC (Orsay).
Mme PECKER-WIMEL	T	Astrophysique.
BALKANSKY		Physique MPC.
LE CORRE	T	Électricité.
DELCROIX	T	Physique théorique (Orsay).
GOURDIN		Physique théorique des hautes énergies. (Orsay).
LEHMANN	T	Phys. exp. des hautes énergies.
NATAF	T	Physique nucléaire et radioactivité (Orsay).
ÉCHALIER		Biologie animale PCB.
BARRAUD		Physiolo. cellulaire.
LIORET		Physiologie vég. (Orsay).
DARS		Géologie structurale et géologie appliqué.
CAMEFORT	T	Botanique (agrégation).
VICHNIEWSKY	T	Mécanique industrielle.
BLAQUIÈRE		Électronique (Orsay).
ARNOUS	T	Physique théorique.
TATIBOUET		Chimie (CSU Orléans).
MALLIVIN	T	Math. propéd. (Orsay).
GAUDEMAR		Chimie propéd.
PEREZ Y JORBA		Physique exp. des Hautes énergies (Orsay).
DAVID	T	Chimie (agrégation Orsay).
BROUSSE	T	Mécanique théorique.
ROSCH	T	Astronomie.
GUY	T	Physique expérimentale.
LAZARD		Math. MPC.
MOREL Pierre		Physique MPC.
ARSAC		Programmation.
LEFEBVRE		Chimie MPC.
CHAPEVILLE		Biochimie.
BENOIT		Physique CPEM.
RIO		Chimie CPEM.
JAUZEIN		Géologie ENS.
PRÉVOST Georges		BV CPEM.
FAVARD P.		BA CPEM.
VILKAS		Chimie CPEM.
Mlle FICINI		Chimie CPEM.
LEQUEUX		Astronomie.
COHEN TANNOUDJI		Physique MPC.
TAVERNIER		Physique CPEM.
Mme ROIZEN		Physique CPEM.
DURAND M.		BA SPCN.
PASCAUD		Physiologie.
Mme PETIT		BA CPEN.
BROUSSE		Géologie (Orsay).
CAGNAC		Physique agrégation (Orsay).
LEBERRE		Zoologie (Orsay).
SCHEFFER		Microbiologie (Orsay).
DE GENNES		Physique des solides (Orsay).
RIOU		Physique nuclé. exp. (Orsay).
CLAUSER		Chimie biol. (Orsay).
CHEVALIER		Physiol. animale (Orsay).
JANCOVICI		Physique atomique (Orsay).
FALK-VAIRANT		Physique nucléaire (Orsay).
FÉTIZON		Chimie propéd. (Orsay).
CERF		Mathématiques (Orsay).
LURCAT		Physique.
RIGAUDY		Chimie S.P.C.N.
SIGWALT		Idem.
FOURNET		Électricité générale.
COLLONGUES		Chimie C.P.E.N.
DUBERT		Biochimie.
LAVOREL		Biologie physico chimique.
MOREL F.		Physiologie comparée.
TALBOT		Génétique chimique.
Mme NOUGARÈDE		Botanique.
FRANÇOIS		Zoologie.
IVANOFF		Océanographie physique.
CADIOT		Chimie organique.
BARUCH		Physique propédeutique.
NOZIÈRES		Physique générale.
BOK		Physique propédeutique.
SLONIMSKI		Génétique.

Secrétaire général..... R. POULLAIN

SUR LE COMPORTEMENT DE DEUX TYPES DE MICROORGANISMES ET DE DIFFÉRENTS ENZYMES EN PRÉSENCE DE PRODUITS DE LA RÉACTION DE MAILLARD

M. JEMMALI

A mes parents,

Bien faible témoignage de mon affection.

SOMMAIRE

I. — Introduction

Historique.
Réaction de Maillard du point de vue physico-chimique
Réaction de Maillard du point de vue physiologique
Objet du travail

II. — Préparation et analyse des prémélanoïdes

1° Préparation
2° Techniques de dosage :

Glucose (*a*) Glucose-oxydase
(*b*) Shaeffer-Hartmann
Glycocolle
Spectres UV
Pouvoir réducteur
pH

3° Résultats analytiques
4° Stérilisation des prémélanoïdines

III. — Première partie : action des prémélanoïdines sur deux types de microorganismes.

A. — Ferments lactiques

1° État de la question
2° Techniques utilisées :

a) Choix des conditions de travail
b) Protocole microbiologique
c) Appareils et modes opératoires

3° Résultats expérimentaux

B. — Ferments citriques.

1° État de la question
2° Techniques utilisées

a) Protocole expérimental
b) Méthodes de dosage

3° Résultats expérimentaux :

a) Choix des conditions de travail :
Souches
Milieu de base
Milieu de conservation
Influence du glucose et du glycocolle
b) Action des prémélanoïdines
c) Influence de la concentration de prémélanoïdines

IV. — Deuxième partie : action des prémélanoïdines sur différents enzymes.

Introduction.

1° La pyruvate décaboxylase.

a) Préparation
b) Dosage d'activité
c) Action des prémélanoïdines
d) Action des concentrations de prémélanoïdines
e) Hypothèses et vérifications

2° La lactacte déshydrogénase.

a) Préparation
b) Dosage d'activité
c) Action des prémélanoïdines
Discussion

3° La Pyruvate décarboxylase oxydative.

a) Préparation
b) Dosage d'activité
c) Action des prémélanoïdines

Conclusion.

V. — Résumé.

Bibliographie.

AVANT-PROPOS

Au terme de quatre années de recherches au Laboratoire de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales de l'Institut National de la Recherche Agronomique, il m'est agréable de trouver ici une occasion d'exprimer ma profonde gratitude à M. Léon PETIT. Il a été pour moi plus qu'un guide, un ami ; par les conseils et les enseignements qu'il n'a cessé de me prodiguer, je lui dois de m'avoir initié à la carrière scientifique.

Ma reconnaissance à M. le Pr CHOUARD dont j'ai eu déjà le privilège de profiter de l'enseignement qu'il dispense à la Sorbonne, et qui m'a fait le grand honneur d'accepter la présidence du Jury.

Je remercie MM. les Prs DUBERT et DEDONDER qui ont bien voulu accepter de juger ce travail, et qui m'ont fait l'honneur de faire partie du Jury de cette thèse.

A M. A. GUILBOT, directeur du Laboratoire de Biochimie et Physico-Chimie des Céréales, je tiens à exprimer mes plus vifs remerciements pour la plus grande bienveillance qu'il a toujours manifestée à mon égard.

A M. BONASTRE, directeur de l'École Nationale Supérieure des Industries Agricoles et Alimentaires, j'adresse mes remerciements pour l'intérêt qu'il a toujours porté à la réalisation de ce travail.

J'exprime ma reconnaissance à M. CLAVEAU pour les conseils éclairés qu'il m'a toujours prodigués.

Mes remerciements vont tout particulièrement à M. COÏC et à Mme LESAINT du C. N. R. A. à Versailles, qui m'ont permis d'utiliser un matériel dont je n'aurais pu disposer ailleurs.

Je remercie MM. DUPUY, AUCLAIR, ADRIAN, DUBOURG, MOREAU pour les discussions fructueuses qui ont aidé à effectuer le travail de cette thèse.

Qu'il me soit permis de rendre un hommage à la mémoire de Mme BARBIER qui s'est toujours acquittée de sa tâche avec dévouement.

Que Mlle CHABUT et tout le Personnel du Laboratoire, qui ont contribué à des titres divers à l'achèvement de ce travail, trouvent ici le témoignage de ma reconnaissance.

J'exprime ma gratitude envers l'I. N. R. A. et envers la Délégation Générale à la Recherche Scientifique et Technique pour l'aide que ces deux Organismes ont bien voulu m'attribuer. (convention 61 Fr 198 du Comité de nutrition animale et humaine).

Ma reconnaissance va aussi au Gouvernement Tunisien ainsi qu'au Service du Bureau d'Accueil à Paris (B. A. E. T. M.) et au Ministère des Affaires Étrangères, grâce auxquels j'ai pu profiter des facilités et du soutien qu'ils m'ont accordés au cours de mes études.

Enfin je remercie M. Palomba de la Société Frigorifique de Tunis qui m'a toujours encouragé pour la réalisation de ce travail.

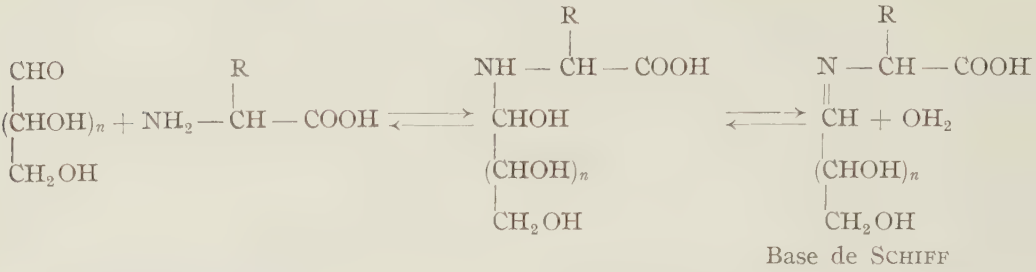
INTRODUCTION

C'est en 1912 que MAILLARD (1) décrivit de façon systématique la réaction entre sucre et amino-acide : lorsqu'on chauffe des mélanges aqueux de divers sucres réducteurs et d'amino-acides, on voit se développer une coloration jaune qui vire vers le brun foncé ; à un certain stade de la réaction se produit un dégagement de gaz carbonique que MAILLARD attribuait à une décomposition du groupe carboxylique de l'acide aminé. Cette réaction entraîne finalement la précipitation de produits insolubles dans l'eau, du genre « humus », les mélanoïdines. On se propose d'appeler « prémélanoïdines » tous les composés autres que les deux molécules initiales et les mélanoïdines proprement dites. Par la suite, MAILLARD, en 1913, montrait aussi que les polypeptides se comportaient de même en présence de sucres réducteurs. Depuis, on a appelé réaction de MAILLARD l'ensemble des interactions glucides réducteurs-protides, et on a montré que la phase de précipitation terminale était l'aboutissement d'une longue chaîne de réactions mettant en jeu des composés solubles, colorés ou non, dont l'identité de la plupart nous est encore inconnue.

Depuis les études de MAILLARD beaucoup de travaux ont été effectués pour mieux connaître la réaction. Plusieurs mises au point bibliographiques permettent de prendre une vue d'ensemble de ces travaux : ENDERS en 1938 (2), STADTMAN en 1948 (3), DANEHY et PIGMAN en 1951 (4), HODGE en 1953 (5), ELLIS en 1959 (6) et REYNOLDS en 1963 (7).

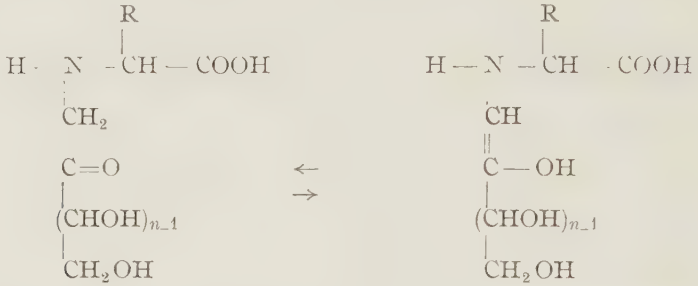
Cette réaction de MAILLARD est donc une réaction de brunissement, mais elle n'est pas la seule à donner naissance à des colorations à partir d'un matériel biologique ; ce brunissement n'est pas non plus la seule caractéristique de la réaction. Cette dernière s'accompagne en effet toujours d'un abaissement du pH, de l'apparition d'un pouvoir réducteur, d'un développement de fluorescence et d'une forte absorption dans l'ultraviolet ; celle-ci est due à la présence de composés carbonylés, aldéhydes et cétones. Une publication de CHICHESTER (8) illustre la complexité du milieu ; cet auteur travaille avec du glucose uniformément marqué au ^{14}C et avec du glycocolle marqué sur le carbonyle ; après chromatographie bidimensionnelle sur papier d'une préparation obtenue par chauffage de glucose et de glycocolle marqués, il repère des composés différents, dont dix-huit fluorescents, cinq réducteurs et trois réagissant à la ninhydrine au même titre que le glycocolle final. Ce nombre est, sans aucun doute, un minimum car il pourrait y avoir des composés non décelés et des taches superposées sur le chromatogramme. En 1953, HODGE (5) a tenté de faire une synthèse rassemblant les faits bien établis et les hypothèses vraisemblables. Il a divisé en trois étapes principales cette réaction complexe.

1° Dans un premier stade, la molécule de sucre et celle d'amino-acide donnent un composé d'addition :



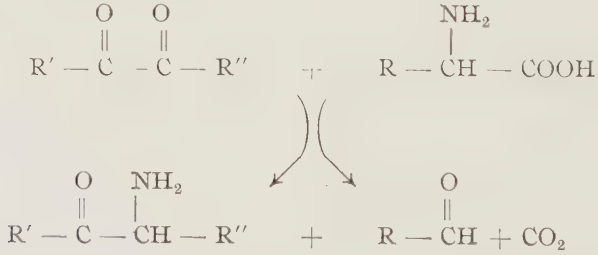
Base de SCHIFF

On obtient ainsi vraisemblablement une base de SCHIFF qui s'isomérise elle-même en N-glycosyl amine N-substituée. Celle-ci subit à son tour une isomérisation par un ré-arrangement de AMADORI, et l'on aboutit finalement à un 1-amino, 1-déoxy, 2-cétose.



Les composés rencontrés dans cette première phase appartiennent en propre au brunissement de type MAILLARD.

2° Dans un deuxième stade, cet amino-déoxy-cétose peut être décomposé selon deux processus : soit par scission, soit par déshydratation. C'est alors qu'apparaissent les petites molécules comme l'acétol, le méthyl-glyoxal, le diacétyle, les aldéhydes glycoliques et glycériques, les dérivés furfuryliques, les réductones. Ces composés donnent une réaction de STRECKER (9) avec l'amino-acide, réaction de transamination et de décarboxylation ; on obtient ainsi un aldéhyde à chaîne plus courte que celle de l'amino-acide initial.



Ce sont les aldéhydes formés à ce stade qui sont pour une grande part responsables de l'absorption ultraviolette et de parfums caractéristiques de la réaction de MAILLARD.

3° Enfin, dans un troisième stade, ces divers composés carbonylés et aminés peuvent réagir entre eux pour donner aldimines et cétimines facilement polymérisables : les composés aldéhydiques se combinant les uns aux autres pour former les aldols. Ainsi, par condensation et polymérisation successives, la chaîne des réactions aboutit à la formation de composés fluorescents et de pigments bruns.

Un certain nombre de paramètres conditionnent, par ailleurs, le déroulement de la réaction de MAILLARD : la température qui joue un rôle très important sur l'intensité du brunissement, la durée de la réaction, le pH et l'hydratation du milieu.

Dès 1914, MAILLARD s'interrogeait sur les éventuelles conséquences biologiques de cette réaction, lorsqu'elle se développe dans des milieux naturels. Elle est en effet susceptible de se produire en de multiples occasions, au cours des traitements subis par les substances alimentaires destinées aux organismes supérieurs, ou par les milieux nutritifs de microorganismes : chauffage, cuisson, stérilisation, conservation de longue durée en milieu faiblement hydraté, etc. Mais, si la physico-chimie de la réaction de MAILLARD a fait l'objet de nombreuses recherches, l'étude de ses répercussions physiologiques a été encore assez peu poussée. Elle a d'abord été menée dans deux directions : en premier lieu, il était évident que la réaction de MAILLARD entraînerait une certaine perte de valeur biologique du fait de la destruction de constituants glucidiques et de constituants protidiques dont elle s'accompagne. De nombreux auteurs, en particulier PATTON et HILL (10, 11), ont cherché à préciser, selon les modalités de la réaction et selon la nature du milieu, l'importance des destructions ainsi provoquées. En second lieu, et pour rendre compte de faits non justifiés par la seule explication précédente, on a émis l'hypothèse selon laquelle, au cours de la réaction, une molécule de glucide initial ou d'un dérivé pourrait venir se greffer sur la chaîne peptidique et gêner, ainsi, l'action ultérieure des enzymes protéolytiques : dans ces conditions, non seulement la réaction de MAILLARD entraînerait une destruction des glucides et des protides, mais la fraction résiduelle de ces derniers pourrait encore voir sa valeur biologique diminuée par une plus grande résistance à l'hydrolyse enzymatique, par empêchement stérique. Sans que l'on puisse dire qu'une preuve irréfutable ait été apportée, MENDEN et CREMER (12) ont fait des essais de digestibilité *in vitro* par la pancréatine sur les protéines du lait chauffé en présence de glucose et ont constaté une diminution de l'attaque pancréatique.

Les travaux effectués sur les microorganismes sont, eux aussi, assez fragmentaires. Citons ceux de ORLA JENSEN en 1933, de SMILEY, NIVEN et SHERMAN en 1943, de RABINOWITZ et SNELL en 1947, de PATTON et HILL en 1948, de PETERSON et ROSE en 1949, de C. S. ROSE en 1952, de FOSTER en 1952, de DEXTERS, KING et CHELDELIN en 1953, de Mc ALLISTER en 1954, de PARKER et ELLIKER en 1954, de ZABRODSKY en 1958, de SHEIKH, GODON et PETIT en 1961. Nous reverrons en détail chacun de ces auteurs au moment d'exposer les recherches effectuées sur les différents microorganismes étudiés. Les résultats obtenus par ces derniers auteurs ont permis d'émettre et d'étayer une troisième hypothèse : celle d'une action propre de certains produits de la réaction de MAILLARD sur le métabolisme des microorganismes.

Le travail que nous avons effectué se rattache à cette dernière hypothèse : il a eu pour but, d'une part, d'élargir le champ des observations à d'autres microorganismes, d'autre part, de compléter les études déjà faites sur *Saccharomyces cere-*

visiae (13) et de vérifier l'hypothèse selon laquelle, même *in vitro*, les prémélanoïdines pouvaient agir comme effecteurs de la décarboxylase pyruvique. Afin de montrer que cette action ne caractérise pas uniquement la décarboxylase, nous avons étudié l'influence de ces prémélanoïdines sur l'alcool déshydrogénase, la lactate déshydrogénase et la pyruvate décarboxylase oxydative.

Nous avons limité les observations aux seules prémélanoïdines dérivées du glucose et du glycocolle ; maintenant constantes les conditions de concentration et de température, nous avons fait varier la composition des prémélanoïdines en agissant sur le temps de réaction. Par ailleurs, l'action de chaque préparation a été étudiée à des concentrations différentes puisqu'il avait été montré que, dans le cas de la levure, la concentration des prémélanoïdines dans le milieu de culture pouvait influer sur le sens même des phénomènes observés.

En ce qui concerne les microorganismes, nous avons utilisé trois souches de bacilles lactiques (*L. arabinosus*, *L. casei* et *L. acidophilus*), deux souches d'*Aspergillus* (*A. niger* et *A. wentii*). Nous avons choisi ces microorganismes pour différentes raisons : d'une part, parce qu'il nous a paru intéressant d'étudier le comportement d'une bactérie et d'une moisissure, d'autre part, parce qu'ils sont appelés, à des degrés divers, à se développer dans un milieu contenant normalement des mélanoïdines : les moûts industriels provenant des mélasses de sucrerie, les milieux biologiques qui contiennent des composés aminés et des sucres réducteurs et qui sont généralement autoclavés ; parce que, enfin, leur métabolisme est orienté — au moins partiellement — dans le même sens et facile à étudier. Les mesures effectuées ont porté, soit sur les produits du métabolisme, soit sur le développement des microorganismes ; elles seront précisées dans chaque cas particulier.

Dans l'exposé qui va suivre, nous commençons par décrire les méthodes générales utilisées dans l'ensemble du travail :

— préparation des prémélanoïdines,
— techniques de dosage,
— résultats analytiques.

Puis, nous exposerons les recherches effectuées *in vivo* avec chacun des microorganismes ; les techniques particulières employées dans chaque cas seront décrites avant de rapporter les résultats obtenus par action des prémélanoïdines.

Enfin, nous étudierons l'action des prémélanoïdines sur les différents systèmes enzymatiques *in vitro*.

PRÉPARATION ET ANALYSE DES PRÉMÉLANOÏDINES

1° Préparation

On prépare des solutions de glucose et de glycocolle de molarité 2 : on introduit 10 ml de chaque solution dans un tube rodé ; après homogénéisation du mélange, on fait chauffer à reflux à 90°C, pendant le temps nécessaire. Les temps de chauffage ont été compris entre 2 et 48 heures, et on a laissé le pH évoluer librement vers les valeurs acides ; dans ces conditions, il n'y a pas eu précipitation de mélanoïdines. Après refroidissement, la préparation de prémélanoïdines est ajustée à un volume de 50 ml.

2° Techniques de dosage

Dans l'impossibilité où l'on est de pouvoir analyser complètement ces milieux complexes dont l'identité de la majeure partie des composants est encore inconnue, nous les avons caractérisés par la teneur en glucose et en glycocolle résiduels qui permettent de calculer les quantités entrées en réaction ; par le relevé des spectres d'absorption dans l'ultraviolet, afin de repérer leurs teneurs en composés carbonylés ; par la mesure du pH et du pouvoir réducteur total.

Le dosage des sucres et des amino-acides dans un mélange de prémélanoïdines demande quelques précautions, car, au cours de la réaction de MAILLARD, se forment des composés susceptibles de présenter des propriétés chimiques analogues à celles sur lesquelles sont fondées les méthodes usuelles de ces deux constituants. C'est pourquoi il est préférable de séparer le sucre et l'amino-acide de l'ensemble du mélange avant de les doser. Néanmoins, le glucose a été dosé par la méthode à la glucose-oxydase (14), appliquée directement à la préparation ; on a comparé les résultats obtenus de cette façon à ceux donnés par la méthode chimique après séparation.

Glucose

a) *Dosage par voie enzymatique dans le milieu complexe* : méthode à la glucose-oxydase, de HUGGETT et NIXON (14).

Le principe du dosage est le suivant : par une réaction d'oxydation catalysée par la glucose-oxydase, le glucose est transformé en acide gluconique avec libération d'eau oxygénée ; ce dernier, en présence de peroxydase, réagit avec un donateur d'hydrogène, l'ortho-dianisidine (DH_2) pour former un colorant rouge. Cette

coloration est proportionnelle à la quantité de glucose dans le milieu ; on mesure l'intensité de celle-ci à 436 mμ :

$$\text{Glucose} + H_2O \xrightarrow[O_2]{\text{Glucose-oxydase}} \text{Acide gluconique} + H_2O_2$$

$$H_2O_2 + DH_2 \xrightarrow{\text{Peroxydase}} 2H_2O + D \text{ (colorant)}$$

Rappelons brièvement le mode opératoire : à 1 ml de solution de prémélanoïdines convenablement diluée, on ajoute 5 ml du mélange tampon-enzyme-chromogène (Biotrol). La réaction se développe à l'obscurité pendant 30 minutes. La courbe-étalon doit être établie pour chaque série de dosages avec le réactif tampon-enzyme-chromogène préparé extemporanément ; la meilleure zone de concentration pour ce dosage se situe entre 20 et 60 γ pour 1 ml de prise d'essai. La précision du dosage est de l'ordre de 2 p. 100.

b) *Dosage par voie chimique, après séparation du glucose* :

On isole le glucose par filtration de la solution de prémélanoïdines à travers une colonne de résine échangeuse de cations. On utilise le Dowex D 50 × 8,50 — 100 dont on a constitué une colonne de 680 mm de hauteur et 17 mm de diamètre. Après lui avoir fait subir deux cycles de traitement NH_4OH (2N) — HCL (2N), suivis d'un lavage à l'eau distillée jusqu'à neutralité de l'effluent, on introduit une prise de 2 ml de la préparation de prémélanoïdines. On rince la colonne à l'eau distillée et on recueille l'effluent par fractions de 5 ml. Le volume de la prise d'essai étant faible par rapport à celui de la résine, il se produit en plus du phénomène d'échange d'ions, un classement des différents constituants de la solution analysée grâce à un processus d'ecclusion. La vitesse d'écoulement est réglée à la valeur de 1 ml en 2 minutes environ. On localise la position du glucose dans l'effluent par la réaction au phtalate d'aniline, effectuée sur une prise de 10 μl. En général, le glucose passe entre 50 et 130 ml. On recueille ces fractions et l'on dose le glucose par la méthode de Shaeffer-Hartmann(15), avec une précision de ± 2 p. 100. On effectue le calcul de sa concentration par référence à une solution étalon, traitée dans les mêmes conditions.

Glycocolle

On le sépare par chromatographie sur papier, dans un solvant monophasique constitué de butanol, de pyridine et d'eau, dans les proportions de 15/50/20. Après une dilution convenable, de manière que les prises d'échantillons de 10 μl apportent au maximum 15 γ d'amino-acide, le chromatogramme est traité d'après la méthode de Thomson (16), qui consiste en un séchage à température ambiante, puis aspersion par une solution de ninhydrine à 0,5 p. 100 et chauffage à 60°C pendant 30 minutes en atmosphère de CO_2 et d'alcool. Signalons que l'on a utilisé avec de bons résultats la méthode de Staron (17). Les taches de glycocolle, nettement séparées de celles du N-glycoside qui réagissent également à la ninhydrine, sont découpées et éluées dans l'alcool à 50 p. 100. On mesure alors la densité optique des éluats à 570 mμ. On calcule ensuite la teneur en glycocolle par référence à la densité optique d'un éluat

correspondant à un dépôt de 10 µl de glycocolle soumis aux mêmes opérations que la prise d'échantillon à analyser. La précision globale est de l'ordre de ± 8 p. 100.

Spectres UV

Les spectres d'absorption dans l'ultraviolet ont été relevés avec un Spectronic 505 Bausch et Lomb, entre 220 et 370 mµ. La dilution est ajustée à une valeur convenable pour mesurer au mieux la densité optique au maximum d'absorption située dans la région de 280-300 mµ. *La figure* 1 représente les spectres entre 220 et 370 mµ

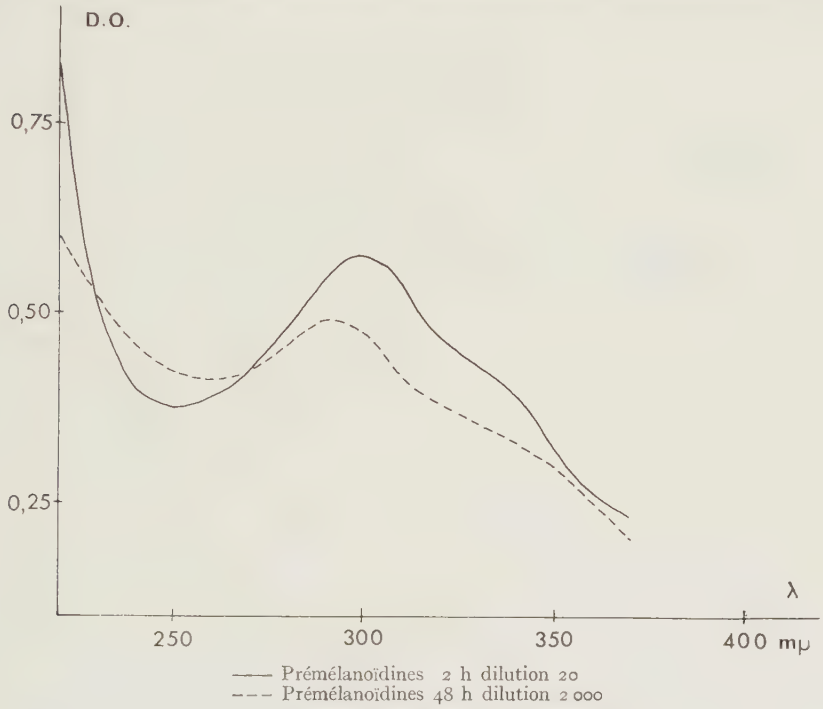


FIG. 1. — *Spectres d'absorption de prémélanoïdines.*

de deux préparations de prémélanoïdines 2 h et 48 h diluées respectivement 20 et 2 000 fois. Nous voyons que le maximum situé à 296 mµ pour la préparation à court temps de chauffage, se déplace vers 285-290 mµ pour la préparation à temps de chauffage prolongé, ce qui correspond à une accumulation de 5-hydroxyméthylfurfural (5 HMF) et à une diminution de la formation de «296» qui a été isolé par PETIT (18). De même, le contrefort entre 320 et 340 mµ, qui est bien défini pour la préparation 2 heures, s'estompe pour la préparation de 48 heures.

Pouvoir réducteur

Il a été déterminé par un dosage selon la méthode de SHAEFFER-HARTMANN (15), directement effectué sur une dilution convenable des préparations de prémélanoïdines ; le résultat est exprimé arbitrairement en glucose.

pH

Le pH est mesuré au Radiometer 25. Ce sont les valeurs de pH de préparations non diluées.

3° Résultats analytiques

Composition des prémélanoïdines

Les résultats obtenus sont exprimés en millimoles par millilitre de solution utilisée pour les essais :

TABLEAU I

Temps de chauffage (en heures)		0	2	8	24	48
Glucose	Glucose-oxydase	0,4	0,39	0,33	0,28	0,17
	Schaeffer-Hartmann	0,4	0,39	0,35	0,26	0,17
N_A		0,4	0,39	0,34	0,29	0,25
N_M		0	0,01	0,06	0,11	0,15
Pouvoir réducteur		0,4	0,43	0,39	0,35	0,28
pH			5,30	4,56	3,96	3,76

(N_A = azote aminé ; N_M = azote dégradé = 0,4 — N_A)

L'examen des résultats du tableau I permet de préciser la notion d'intensité de la réaction. La différence d'une part, entre le réducteur total (glucose + réducteurs non sucre) et la valeur vraie du glucose déterminée par voie chimique ou après séparation par voie enzymatique ; d'autre part, entre l'azote total et l'azote aminé, donne une idée de l'importance de l'évolution de la réaction en fonction du temps de chauffage.

4° Stérilisation des prémélanoïdines

On filtre la solution à travers une membrane Millipore (Jouan), type HA, ayant des pores de 0,45 μ de diamètre.

Première Partie

ACTION DES PRÉMÉLANOÏDINES SUR DEUX TYPES DE MICRO-ORGANISMES

A. — FERMENTS LACTIQUES

1° État de la question

On a généralement mis en évidence une influence du chauffage du milieu de culture sur les bactéries lactiques : lorsqu'on chauffe un milieu biologique aux températures de stérilisation, il se produit des modifications qui influent d'une façon notable sur le développement des microorganismes. Un certain nombre d'auteurs ont essayé d'apporter une explication à ce phénomène selon qu'ils ont observé une stimulation ou une inhibition.

Dans le premier cas, Orla Jensen (19) attribue ce pouvoir de stimulation à des substances provenant de la décomposition par chauffage des sucres réducteurs contenus dans le milieu. Rabinowitz et Snell (20), Smiley, Niven et Sherman (21) pensent qu'au cours du chauffage il se forme des substances réductrices responsables de l'effet stimulant ; les trois derniers auteurs suggèrent que des substances telles que l'acétaldéhyde et l'acide pyruvique peuvent jouer le rôle d'accepteurs d'hydrogène dans le métabolisme initial des hydrates de carbone ; en 1952, C. S. Rose (22) découvre une action toxique sur *L. bifidus* de la cystéine autoclavée et montre en même temps que cette toxicité disparaît en chauffant la cystéine avec un sucre réducteur. D. Rose et Peterson (23) signalent un léger effet favorable du glucose chauffé dans le milieu de culture par comparaison au milieu de culture dans lequel le glucose a été autoclavé séparément. Rogers., King et Cheldelin (24) constatent que le N-glucosyl-glycine (NGG), produit dans le premier stade de la réaction glucose-glycocolle, est capable d'activer la croissance de *Lactobacillus gayoni*. Dans un travail sur la nutrition des microorganismes (25), les deux derniers auteurs signalent que d'autres espèces telles que *L. acidophilus* et *Leuconostoc mesenteroïdes* répondent de même favorablement à ce NGG. Ramsey et Lankford (26) ont mis en évidence une action activatrice du glucose chauffé en milieu phosphate sur de nombreux microorganismes et, en particulier, sur *L. fermenti*. Signalons que le phénomène observé par tous ces auteurs porte sur la phase initiale de croissance, c'est-à-dire consiste en un développement rapide des microorganismes à partir d'un faible « inoculum ». D'après Auclair et Portmann (27), l'effet stimulant du lait autoclavé sur la croissance de *Lactobacillus lactis* 0_{37} serait dû, principalement à la présence dans ce lait d'acide formique produit à partir du lactose au cours du chauffage à l'autoclave.

Dans le cas d'une inhibition, signalons les travaux de Foster (28), de Parker et Elliker (29), sur le lait ayant subi un chauffage prolongé : ces derniers auteurs

attribuent le pouvoir d'inhibition à une diminution de l'azote aminé libre due à la présence du lactose. Certains auteurs, comme PATTON et HILL (30), Mc ALLISTER (31), LANKFORD, RAVEL et RAMSEY (32), AUCLAIR en 1953 (33), expliquent l'effet défavorable de la stérilisation à l'autoclave des milieux de base contenant des sucres réducteurs, par une disparition de certains facteurs de croissance, et, en particulier, des acides aminés soufrés ; d'autres, comme AUCLAIR et PORTMANN en 1956 (34), FINKELSTEIN et LANKFORD (35), l'attribuent à la formation de substances inhibitrices.

A l'exception des travaux de ROGERS, KING et CHELDELIN (24), qui mettent en évidence d'une manière explicite les possibilités d'action de composés provenant de l'interaction du glucose et du glycocolle sur la croissance des bactéries lactiques, on peut dire que les publications énumérées ne permettent en aucune façon de conclure à une action propre des produits de la réaction de MAILLARD.

2° Techniques particulières utilisées

a) *Choix des conditions de travail*

Souches.

Les essais ont été conduits sur trois souches homofermentatives : *Lactobacillus arabinosus, Lactobacillus casei et Lactobacillus acidophilus* NCDO1. Elles sont entretenues sur milieu gélosé de DE MAN, ROGOSA et SHARPE (MRS) (36), avec repiquage hebdomadaire, puis, elles sont conservées à — 15°C.

Milieux de base.

Nous avons essayé deux types de milieux de culture, l'un synthétique, l'autre naturel. Avec le premier, le milieu de SNELL et WRIGHT (37), d'une part, il nous a été difficile d'obtenir des résultats reproductibles, d'autre part, la phase de latence est trop longue : elle dure parfois plus de dix heures ; nous admettons avec MONOD (38), que ce retard est dû à l'existence dans le milieu synthétique de substances toxiques, probablement des ions métalliques à l'état de traces et que la croissance au taux maximum ne peut s'établir qu'une fois cet effet toxique neutralisé ; de plus, le milieu donne lieu assez souvent à la formation d'un précipité, sinon dès sa préparation, du moins pendant la croissance des cultures.

Avec le milieu naturel, les lactobacilles donnent une culture abondante et la phase de latence est courte du fait que les colloïdes que ce milieu renferme, jouent peut-être à l'encontre des substances toxiques, un rôle protecteur ; par contre, avec ce milieu, on ne peut éviter les actions parasites éventuelles des dérivés de la réaction de MAILLARD qui pourraient être apportés par les produits naturels (extraits de malt, de levure et de viande) : finalement, nous avons porté notre choix sur deux milieux naturels : milieu de JOHNSON (39) et milieu MRS ; nous les avons légèrement modifiés, en limitant au minimum indispensable l'ajout du produit naturel.

Qu'il s'agisse de l'un ou de l'autre, nous avons pu obtenir des cultures très denses, avec un temps de latence peu marqué (2 heures 30).

	Milieu de JOHNSON originel (g)	Milieu de JOHNSON appauvri (g)
Mélange salin glucosé	20	20
Extrait de levure (Difco)	10	1
Lait peptonisé (Difco)	10	1
Acétate de sodium	10	10

pH = 6,8. On amène à 1 000 ml avec de l'eau distillée.

La composition du *mélange salin glucosé* est la suivante :

	(g)
Glucose	1 000
PO_4H_2K	25
PO_4HK_2	25
SO_4Mg hydraté	10
SO_4Fe	1
SO_4Mn	1
ClNa	1

	Milieu MRS originel	Milieu MRS appauvri
Extrait de viande (Difco) (g)	10	2
Peptone (Difco) (g)	10	2
Extrait de levure (Difco) (g)	5	1
Glucose (g)	20	20
Acétate de sodium (g)	5	5
PO_4HK_2 (g)	2	2
Di-ammonium citrate (g)	2	2
SO_4Mg ($7H_2O$) (g)	0,200	0,200
SO_4Mn ($4H_2O$) (g)	0,050	0,050
Tween 80 (ml)	1	1

pH = 6,6. On amène à 1 000 ml avec de l'eau distillée.

Ces milieux étant suffisamment tamponnés, l'ajout de prémélanoïdines n'entraîne pas de variation du pH par rapport au témoin.

b) *Protocole microbiologique*

La veille du dosage, on repique la souche sur un milieu liquide de même composition que le milieu de base ; on laisse incuber cet « inoculum » pendant 20 h, à 30°C.

Au moment de l'emploi, on prend 0,5 ml de l'inoculum, on complète à 10 ml avec de l'eau distillée afin de diluer la culture et de pouvoir prélever exactement 1 ml destiné à l'ensemencement. La dose d'inoculum utilisée a été choisie au cours d'expériences préliminaires, de manière que les cultures des différentes souches parviennent à la fin de leur croissance maximum après 48 heures d'incubation. Pour éviter tout apport de produits de la réaction de MAILLARD provenant de la stérilisation du milieu par chauffage, nous stérilisons celui-ci par filtration à travers une membrane en amiante, stérilisante, type « EK » (EMACO). Les milieux ensemencés sont mis à incuber à 36°C.

c) *Appareils et modes opératoires*

Nous décrirons le mode opératoire et les méthodes différentes de dosage, selon qu'il s'agit d'étudier l'acidité, ou de suivre le développement des cultures bactériennes.

Dosage d'acide lactique.

Nous utilisons des tubes à essai 200 × 20, dans chacun desquels on met 10 ml de milieu de base ; on leur ajoute :

— soit 1 ml de la préparation de prémélanoïdines ;

— soit pour réaliser l'essai témoin, 1 ml d'un mélange de même composition en glucose et en glycocolle que la préparation étudiée, ceci pour des raisons que nous expliciterons plus loin. Pour doser l'acidité lactique, on transvase le contenu des tubes dans une série de béchers de 100 ml et on rince plusieurs fois avec de l'eau distillée en utilisant un volume d'environ 10 ml. On dose ensuite par la soude (0,1 N) ; lorsqu'on a affaire à un jus clair, on utilise du bleu de bromothymol comme indicateur coloré, quand il s'agit de milieu foncé dû à l'ajout de prémélanoïdines, on dose au pHmètre jusqu'à pH = 6,7.

Mesures néphélométriques.

L'appareil utilisé est le biophotomètre de Bonet-Maury et Jouan qui permet d'enregistrer automatiquement l'évolution dans le temps de l'opacité des milieux de culture. Il comporte six cuves disposées circulairement dans une enceinte thermostatique autour d'une source de lumière. Le faisceau lumineux traverse successivement un diaphragme réglable, la cuve à culture à faces parallèles et tombe sur une cellule photoélectrique. Chacune de ces cellules, correspondant à chacune des cuves, est reliée à un galvanomètre enregistreur multivoies ; ce dernier est commuté automatiquement toutes les 20 secondes sur chacune des six cellules : la courbe correspondant à chaque faisceau traduit en pourcentage de transmission la variation d'opacité du contenu à mesurer. A l'intérieur de chaque cuve, se trouve un barreau aimanté permettant une agitation électromagnétique régulière. Chacune d'elles contient 10 ml de milieu de base auquel on ajoute :

soit 1 ml de prémélanoïdines ;
soit 1 ml de glucose-glycocolle.

3° Résultats expérimentaux

a) *Action propre du glucose et du glycocolle*

Nous avons cherché d'abord à établir si le glucose et le glycocolle apportés par les prémélanoïdines jouaient le rôle de facteurs limitants dans ces milieux ; nous avons ajouté des doses croissantes de glucose et de glycocolle susceptibles d'être apportées par les prémélanoïdines étudiées. Nous avons suivi le développement de chaque microorganisme au biophotomètre. Les résultats du tableau 2 sont exprimés en unités de densité optique (D = 2 — log T) et correspondent à la phase à taux de croissance nul ou phase maximum obtenue généralement après 48 h d'incubation. Chaque valeur représente la moyenne de trois essais simultanés.

TABLEAU 2

	L. arabinosus	*L. casei*	*L. acidophilus*
Concentration de glucose en mg/ml de milieu			
20	0,69	0,51	0,60
25	0,81	0,60	0,60
30	0,81	0,69	0,69
Concentration de glycocolle en mg/ml de milieu			
0	0,69	0,51	0,60
2	0,69	0,60	0,60
3	0,69	0,59	0,50

Il apparaît donc que le glucose peut avoir un rôle sensiblement limitant, surtout pour *L. arabinosus*, tandis que le glycocolle n'intervient que très peu, seul, aux faibles doses, pour *L. casei*. Pour plus de sûreté, nous avons dû réaliser dans nos essais un témoin particulier recevant les quantités de glucose et de glycocolle apportées par les prémélanoïdines.

b) *Action des différentes prémélanoïdines*

Les préparations étudiées diffèrent entre elles par l'intensité à laquelle la réaction a été poussée : toutes choses égales d'ailleurs, cette intensité de réaction est fonction du temps de chauffage. Nous avons mesuré la production d'acide accumulé et l'opacité du milieu de culture lorsqu'aux milieux de base décrits plus haut, on ajoute une même quantité de diverses préparations de prémélanoïdines.

Les courbes de la *figure 2* montrent, à titre d'exemple, et pour la souche *L. acidophilus*, l'évolution au cours du temps, de l'acidité - exprimée en millimoles d'acide lactique — et de l'opacité exprimée en pourcentage de transmission ; elles se rapportent à des cultures témoins et à des cultures en présence de prémélanoïdines 48 h. Les courbes de croissance présentent dans la partie moyenne une phase exponentielle ; pour comparer les taux de croissance dans cette zone, on calcule la densité

optique (D = 2 − log T), puis, on prend le logarithme dont on représente la variation en fonction du temps. On a alors une relation linéaire entre log D et t.

$D = D_0 2^{\mu t}$ où μ est le taux de croissance : temps de division par unité de temps. $\log D = \log. D_0 + \mu (\log 2) t$. La pente de la partie linéaire est donc proportionnelle à μ, que l'on calcule facilement. D'autre part, l'intersection de la droite avec l'axe des abscisses donne de façon précise le temps de latence. En ce qui concerne les courbes d'acidité, on constate qu'elles sont des droites bien définies dans l'intervalle 10 h-27 h, les vitesses de production d'acide nous sont données directement par la valeur des pentes et le temps de latence peut être approximativement connu par extrapolation ; les valeurs obtenues ne sont pas précises et les variations ne sont significatives que si elles sont importantes. Les tableaux 3 à 8 sont relatifs à des cultures en présence de prémélanoïdines agissant à la concentration maximum c'est-à-dire ajoutées au milieu sans dilution préalable (nous verrons plus loin l'action éventuelle de ces dilutions). Nous y avons rassemblé les résultats obtenus par chacune

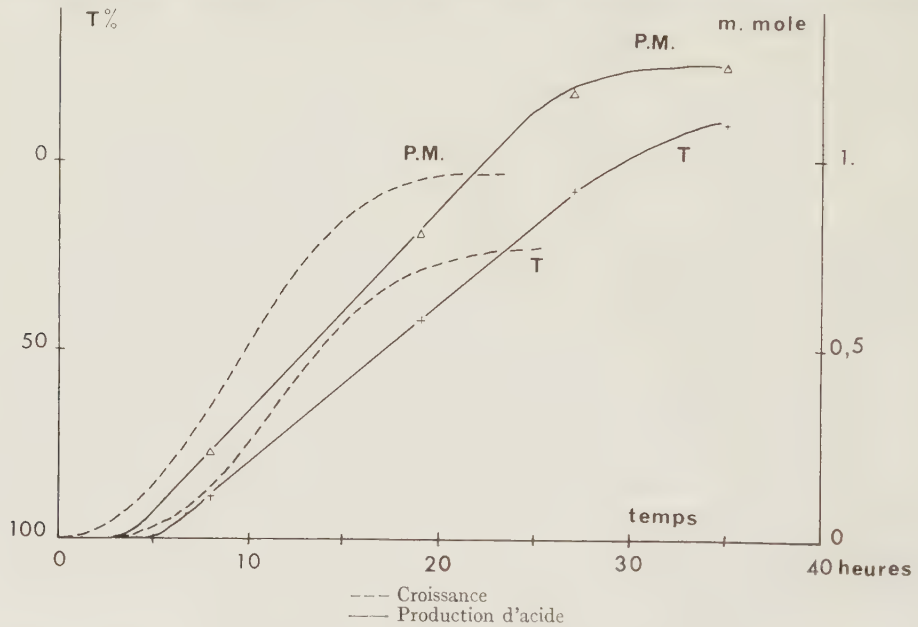


FIG. 2. — *Croissance et production d'acide de* Lactobacillus acidophilus
L'échelle de droite represente l'acidité en millimoles
celle de gauche l'opacité en pourcentage de transmission

des deux méthodes d'observation : t_A, t_c, sont respectivement les temps de latence, en heures, relatifs à la production d'acide et à la croissance ; μ : le nombre de divisions cellulaires par heure ou taux de croissance ; V : vitesse de production d'acide en millimoles par heure, et D_M : la densité optique en fin de croissance. De plus, nous avons fait figurer les valeurs des rapports $\frac{V}{V_T}$ et $\frac{\mu}{\mu_T}$ relatifs soit à la production d'acide, soit aux mesures opacimétriques. Ces rapports sont supérieurs à 1 dans le cas d'une activation, inférieurs à 1 dans le cas d'une inhibition. Chacune des valeurs V et V_T figurant dans ces tableaux est la moyenne de quatre ou six essais.

— *L. arabinosus*

TABLEAU 3

Mesure de l'acidité lactique

Temps de réaction en heures	2		8		24		48	
	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai
t_A	6	5,30	6	5,30	6	5,30	6	5,30
$V \times 10^{-1}$	0,43	0,47	0,42	0,41	0,40	0,39	0,40	0,51
$\frac{V}{V_T}$	1,09		0,97		0,97		1,27	

TABLEAU 4

Mesure de la croissance

Temps de réaction en heures	2		8		24		48	
	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai
t_C	2,30	2,20	2,30	2	2,30	2	2,40	2
D_M	0,70	0,69	0,66	0,69	0,68	0,68	0,69	0,80
μ	1,70	1,76	1,68	1,70	1,70	1,80	1,70	1,85
$\frac{\mu}{\mu_T}$	1,03		1,01		1,05		1,08	

— *L. casei.*

TABLEAU 5

Mesure de l'acidité lactique

Temps de réaction en heures	2		8		24		48	
	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai
t_A	5,30	5	5,30	5	5,30	5	5,30	4,30
$V \times 10^{-1}$	0,28	0,27	0,29	0,30	0,31	0,32	0,27	0,32
$\frac{V}{V_T}$	0,96		1,03		1,03		1,18	

TABLEAU 6

Mesure de la croissance

Temps de réaction en heures	2		8		24		48	
	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai
t_C	3	2,30	3	2,30	3	2	3	2
D_M	0,60	0,60	0,58	0,60	0,60	0,69	0,60	0,76
μ	1,40	1,35	1,45	1,50	1,40	1,55	1,45	1,60
$\frac{\mu}{\mu_T}$	0,96		1,04		1,10		1,10	

— *L. acidophilus.*

TABLEAU 7

Mesure de l'acidité lactique

Temps de réaction en heures	2		8		24		48	
	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai
t_A	5	4,30	5	4,30	5	3,30	5	3,30
$V \times 10^{-1}$	0,40	0,40	0,40	0,42	0,41	0,46	0,42	0,55
$\frac{V}{V_T}$	1,00		1,05		1,12		1,30	

TABLEAU 8

Mesure de la croisssance

Temps de réaction en heures	2		8		24		48	
	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai
t_C	3	3	3	2,30	3	2	3	1
D_M	0,69	0,69	0,68	0,66	0,68	0,69	0,69	1,30
μ	2,55	2,55	2,53	2,58	2,60	2,60	2,60	3,20
$\frac{\mu}{\mu_T}$	1,00		1,02		1,00		1,23	

Pour chacune d'elles, nous avons appliqué les tests d'homogénéité relatifs aux petits échantillons. Il en est résulté que les rapports $\frac{V}{V_T}$ n'avaient de signification à 95 p. 100 que lorsqu'ils étaient supérieurs à 1,10 ou inférieurs à 0,90. Lorsque ce rapport est trouvé égal à 1,20, la différence entre le V et le V_T correspondant est significative à plus de 99 p. 100. Pour les valeurs μ et μ_T, étant donnée la bonne reproductibilité des courbes de croissance obtenues au biophotomètre, on peut attribuer une signification aux résultats au-delà de 95 p. 100.

Voyons d'abord pour chacune des souches examinées la façon dont elle réagit à la présence des prémélanoïdines.

L. arabinosus.

Si nous considérons d'abord la production d'acide lactique, nous constatons que seule la préparation de 48 h nous donne un rapport $\frac{V}{V_T}$ significativement supérieur à 1, c'est-à-dire, traduisant une activation certaine ; en aucun cas, par contre, le temps de latence n'est modifié par rapport au témoin. Les mesures de croissance ne présentent un parallélisme avec les précédentes qu'en ce qui concerne la densité optique du milieu final : seule la préparation de 48 h augmente nettement cette densité optique qui passe de 0,69 à 0,80. Par contre, elles traduisent pour toutes les préparations une action faible, mais constante, sur le temps de latence qui, dans trois cas sur quatre, se trouve abrégé de 20 p. 100 environ.

Étant donné la précision avec laquelle ce temps est déterminé, cette variation est certainement significative. D'une façon générale, donc, on peut conclure que, dans nos conditions expérimentales du moins, *L. arabinosus* ne réagit qu'à la présence de prémélanoïdines correspondant à un temps de chauffage suffisamment prolongé.

L. casei.

Là aussi, la production d'acide lactique n'est significativement affectée que par la préparation de 48 h ; c'est également la seule préparation qui altère sensiblement le temps de latence, le diminuant de 1 h, soit 20 p. 100 par rapport au témoin. Par contre, les courbes de croissance permettent de déceler une influence des prémélanoïdines dès un temps de chauffage de 24 h, puisque, comme pour une préparation de 48 h, nous obtenons un rapport $\frac{\mu}{\mu_T}$ de 1,10, qui s'est avéré reproductible.

De même, la densité optique totale, D_M, est nettement accrue dans la phase stationnaire de croissance, pour les deux mêmes préparations. Là encore, les temps de latence sont nettement diminués.

L. acidophilus.

On constate que la production d'acide lactique est également accélérée par la présence de prémélanoïdines de 24 h et de 48 h. Dès 24 h, apparaissent des composés qui diminuent le temps de latence et tendraient à accélérer la vitesse d'accumulation de l'acide lactique.

Les mesures de croissance traduisent également une influence très favorable de

la préparation de 48 h qui augmente la vitesse de croissance $\frac{\mu}{\mu_T} = 1{,}23$, et aussi la quantité totale des micro organismes formés ; de plus, toutes les préparations tendent à abréger la durée de la phase de latence de plus de 20 p.100.

c) *Influence de la concentration des prémélanoïdines*

Dans les tableaux 9 à 14, nous avons rassemblé les résultats relatifs aux variations $\frac{V}{V_T}$ et $\frac{\mu}{\mu_T}$ en fonction des dilutions de prémélanoïdines. Nous n'avons pas retenu les valeurs des temps de latence, et du taux maximum de croissance qui ne sont significatives que pour *L. acidophilus* aux très faibles dilutions.

L'examen des résultats montre une action activatrice, faible mais reproductible des préparations diluées de prémélanoïdines 2 h — 8 h — 24 h, sur *L. arabinosus* et *L. casei*. Par contre, la préparation 48 h voit son influence diminuer lorsqu'augmente la dilution. Notons aussi, que les souches dont l'activité n'a pas été modifiée par la présence des préparations de prémélanoïdines non diluées ont une tendance à l'activation lorsqu'on ajoute des prémélanoïdines diluées.

— *L. arabinosus.*

TABLEAU 9

Acidité : $\frac{V}{V_T}$

Prémélanoïdines de	Dilutions					
	1	10	10^2	10^3	10^4	∞
2 heures.....	1,09	1,10	1,11	1,03	1,02	1
8 heures.....	0,97	1,06	1,03	1,00	0,98	1
24 heures.....	0,97	1,13	1,16	1,00	1,07	1
48 heures.....	1,27	1,20	1,10	1,04	1,01	1

TABLEAU 10

Croissance : $\frac{\mu}{\mu_T}$

Prémélanoïdines de	Dilutions					
	1	10	10^2	10^3	10^4	∞
2 heures.....	1,03	1,06	1,06	1,03	1,00	1
8 heures.....	1,01	1,01	1,00	1,00	0,98	1
24 heures.....	1,05	1,04	1,03	1,00	1,05	1
48 heures.....	1,08	1,06	1,05	1,00	1,00	1

— *L. casei.*

TABLEAU 11

Acidité : $\frac{V}{V_T}$

Prémélanoïdines de	Dilutions					
	1	10	10^2	10^3	10^4	∞
2 heures.....	0,96	1,00	1,02	1,02	1,03	1
8 heures.....	1,03	1,06	1,00	1,15	1,02	1
24 heures.....	1,10	1,15	1,10	0,96	0,98	1
48 heures.....	1,18	1,17	1,10	1,09	1,04	1

TABLEAU 12

Croissance : $\frac{\mu}{\mu_T}$

Prémélanoïdines de	Dilutions					
	1	10	10^2	10^3	10^4	∞
2 heures.....	0,96	1,02	0,98	1,03	1,00	1
8 heures.....	1,04	1,00	1,10	1,10	1,00	1
24 heures.....	1,10	1,00	1,10	1,00	1,00	1
48 heures.....	1,10	1,10	1,10	1,09	1,00	1

— *L. acidophilus.*

TABLEAU 13

Acidité : $\frac{V}{V_T}$

Prémélanoïdines de	Dilutions					
	1	10	10^2	10^3	10^4	∞
2 heures.....	1,00	1,04	1,04	1,00	1,00	1
8 heures.....	1,05	0,95	1,04	1,05	1,00	1
24 heures.....	1,12	1,10	1,01	1,00	1,00	1
48 heures.....	1,29	1,22	1,14	1,14	1,00	1

TABLEAU 14

Croissance : $\frac{\mu}{\mu_T}$

Prémélanoïdines de	Dilutions					
	1	10	10^2	10^3	10^4	∞
2 heures.....	1,00	1,02	1,00	0,98	1,00	1
8 heures.....	1,02	0,98	1,04	1,00	1,00	1
24 heures.....	1,00	1,00	0,98	1,00	1,00	1
48 heures.....	1,23	1,20	1,20	1,10	1,00	1

B. — FERMENTS CITRIQUES

1° État de la question

La production d'acide citrique par fermentation constitue l'une des bases industrielles de préparation de cet acide. Bien que le terme de fermentation citrique soit ici certainement une expression défectueuse, nous l'utilisons cependant au cours de l'exposé en raison de sa commodité et de son emploi courant dans l'industrie.

Depuis les recherches de Wehmer en1893 (40, 41), il est connu qu'un grand nombre de moisissures ont la possibilité de produire de l'acide citrique à partir de milieux de culture convenables et il est vite apparu que les souches d'*Aspergillus* étaient capables d'en assurer l'obtention avec un bon rendement : de nombreux travaux ont été consacrés au mécanisme de la formation d'acide citrique : différentes théories ont été proposées, mais aucune n'apporte d'explication certaine du phénomène observé.

On admet généralement, d'après les travaux de Lewis, Weinhouse (42),Martin (43), Ramakrishnan (44, 45), qu'*Aspergillus niger* utilise surtout le cycle de Krebs pour la biosynthèse de l'acide citrique.

Le schéma ci-dessous, extrait de *Physiology of Fungi*, rappelle le cycle de Krebs et les différentes réactions latérales possibles.

D'après Lewis et Weinhouse (42), l'accumulation des citrates est considérée comme résultant d'un mauvais fonctionnement du cycle, qui se traduit par l'apparition de produits de débordement — *overflow product* —, dont l'acide citrique est un représentant. Il ne peut être question d'étudier ici la fermentation citrique elle-même ; mais, étant donné les difficultés que nous avons rencontrées dès le début de notre travail dans le choix de nos conditions expérimentales, nous allons brièvement passer en revue les principaux paramètres qui conditionnent la production d'acide citrique par les *Aspergillus* étudiés. La plupart des travaux se rapportent à des cultures sur milieux synthétiques ; quelques-uns cependant ont été réalisés en milieu naturel, mélasses de canne et de betteraves.

En ce qui concerne la fermentation en milieu synthétique, les conditions d'obtention d'un bon rendement en acide citrique — par des souches d'*Aspergillus niger* cultivées en surface — ont été précisées en 1917 par Currie (47), dont les observations ont été corroborées et complétées par Doelger et Prescott en 1934 (48). La production d'acide citrique est essentiellement sous la dépendance de la nature des souches et du milieu de conservation, du choix de la source carbonée et de celui des sources minérale et azotée ainsi que des facteurs physiques intervenant au cours de la fermentation.

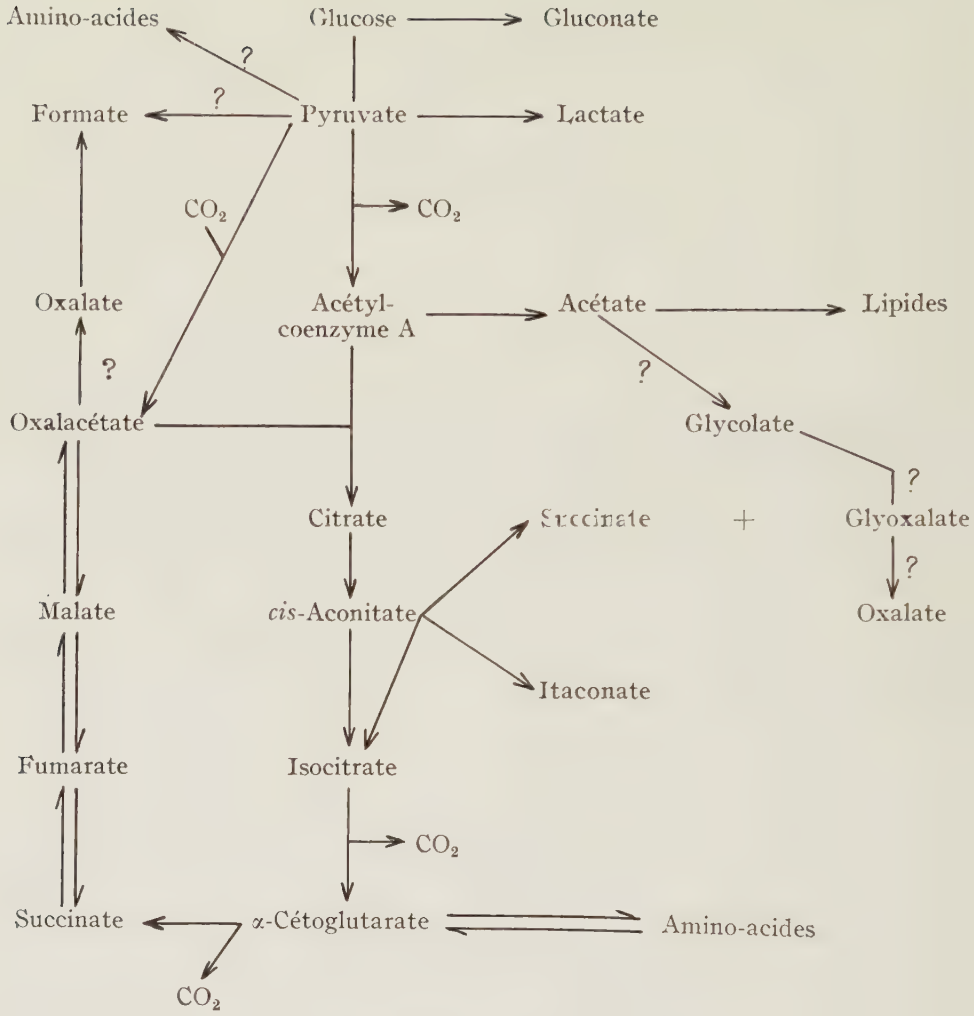


Schéma d'après COCHRANE (46)

a) *Nature des souches et du milieu de conservation*

Parmi les huit souches d'*Aspergillus niger* isolées par DOELGER et PRESCOTT (48), seules quelques-unes se sont montrées capables de produire de l'acide citrique avec un bon rendement ; celui-ci est d'ailleurs tributaire du mode de conservation des souches : ces auteurs préconisent un transfert de spores, à intervalles réguliers, dans un milieu similaire en composition chimique à celui employé pour le milieu de fermentation ; PING SHU et JOHNSON (49), par contre, proposent l'emploi de milieux différents : il faut noter que ces auteurs travaillent en culture submergée et non en culture en surface comme les précédents. PERLMAN (50) observe que les subcultures obtenues par isolement de spores de colonies d'une souche donnée présentent de grandes différences dans leur aptitude à la production d'acide citrique.

b) *Choix de la source carbonée*

Si le glucose peut constituer, dans certains cas, une source carbonée pour *Aspergillus niger* et *A. wentii* et peut donner lieu à de bons rendements en acide citrique, il a été cependant observé que la meilleure source carbonée est le saccharose, utilisé à une concentration de 14 p. 100 (48). Doelger et Prescott émettent l'hypothèse que l'hydrolyse du saccharose pourrait provoquer une activation de l'un des enzymes intervenant dans la chaîne de réactions conduisant à l'acide citrique, sans préciser davantage le mécanisme du phénomène.

c) *Choix de la source minérale*

Les éléments minéraux qui se sont révélés indispensables sont le potassium, le soufre, le magnésium et le phosphore. Différentes variantes dans la nature et la teneur des sels ont été proposées. Il semblerait que la composition minérale qualitative doive être adaptée à la nature de la souche utilisée et qu'il existe une zone optimum de la concentration en sels minéraux au-delà de laquelle le rendement en acide citrique diminue. D'une manière générale, un bon rendement est obtenu quand le matelas mycélien est mince et la sporulation légère ou quasi absente. L'utilisation de minéraux, autres que ceux mentionnés ne semble pas généralement nécessaire ; on a pourtant prétendu que le fer et le zinc pouvaient accélérer la formation d'acide citrique. Ceci est en désaccord avec les résultats obtenus par D. Bertrand et A. de Wolf (51) ; ces auteurs trouvent que la carence du milieu en fer et en manganèse entraîne une diminution de la synthèse de l'aconitase, et, par là-même, une accumulation de l'acide citrique. Ces minéraux sont donc, indépendamment l'un de l'autre, nécessaires pour la transformation de l'acide citrique en acide cis-aconitique dans le cycle de Krebs. Dans notre cas, comme Bertrand et de Wolf, nous avons observé que les sels de fer et de zinc n'augmentent pas le rendement en acide citrique, mais stimulent la croissance ; d'ailleurs, selon Quilico et Dicapua (52), l'effet du fer sur la production d'acide citrique par *A. niger* dépendrait de la souche utilisée. C'est aussi l'avis de Perlman (50), Dorell et Johnson (1946) (53), à la suite d'une étude des effets de l'addition d'ions métalliques sur la production d'acide citrique.

d) *Choix de la source azotée*

A l'exception de certains problèmes de biosynthèse d'amino-acides, le métabolisme azoté des champignons a été relativement peu étudié en profondeur et il n'apparaît pas actuellement possible de tirer une conclusion suffisamment générale des essais effectués en ce domaine. Disons simplement qu'il n'y a pas de schéma d'assimilation azotée susceptible d'être appliqué à tous les champignons et qu'il ne semble pas exister une quantité optimum d'azote pour une culture ; la demande en azote dépendrait surtout de la source de carbone fournie et de l'existence éventuelle de facteurs limitants (Steinberg et Bowling, 54).

e) *Choix des facteurs physiques*

Différents auteurs ont étudié l'action sur la fermentation citrique de la température, du pH, du rapport volume/surface, de l'oxygénation. En particulier, Doelger et Prescott (48) se sont livrés à une étude systématique de ces facteurs ; là encore,

les résultats révèlent que le rendement en acide citrique dépend de la souche utilisée.

La fermentation de l'acide citrique par *Aspergillus niger*, en milieu naturel, à partir de mélasses de canne brute, a été étudiée par Perlman, Kita, Peterson (1946) (55). Ils trouvent que le rendement est médiocre en comparaison de celui obtenu à partir de milieux synthétiques, mais qu'il peut être augmenté et rendu comparable à ce dernier par traitement de la mélasse au ferrocyanure de potassium. Ils concluent donc que ce sont des substances minérales de la mélasse, précipitées au cours de ce traitement, qui sont responsables de l'effet d'inhibition sur la production d'acide citrique.

Roberts et Murphy (56), en 1944, Gerhardt, Dorrell, Baldwin (57), en 1946, ont étudié la fermentation citrique de mélasses de betteraves par *A. niger*. Là aussi, le traitement préalable de la mélasse par le ferrocyanure de potassium augmente le rendement. D'après Clark (58), le rendement en acide citrique obtenu à partir de mélasses de betteraves traitées au ferrocyanure de potassium dépend de la concentration du ferrocyanure, des conditions de stérilisation et du pH de la mélasse.

De cet examen général de la question, il ressort d'abord qu'aucune allusion n'a été faite jusqu'alors à une éventuelle action des produits de la réaction de Maillard sur le comportement des microorganismes producteurs d'acide citrique. D'autre part, les indications relatives en particulier aux conditions optimales de culture et de conservation des souches, à la nutrition azotée ou minérale, sont, ou bien controversées, ou bien très imprécises ; à tel point qu'on a pu dire que le comportement de chaque souche devait dépendre de conditions susceptibles de varier d'un laboratoire à un autre, en fonction de facteurs impossible à définir (59).

Pour cette raison, nous avons dû étudier, pour chacune des souches que nous avons utilisées, les conditions de culture et d'entretien ainsi que l'influence de l'amino-acide apporté par les prémélanoïdines, avant d'aborder l'examen de l'influence propre de ces dernières.

2° Techniques particulières utilisées

a) *Protocole expérimental*

Inoculum.

On prépare une suspension de spores à partir de nos souches de la façon suivante : les spores de moisissures sont conservées dans la terre de jardin stérile ; au moment de l'utilisation, on fait un isolement sur un milieu convenable, dont la composition s'est révélée en fonction du microorganisme utilisé comme nous le verrons plus loin ; à partir d'une colonie bien isolée sur une boîte de Petri, on fait trois repiquages successifs sur tube incliné et avec le même milieu. Lorsque la tranche du dernier tube repiqué est suffisamment recouverte de spores, on y ajoute une vingtaine de billes de verre stériles de 2 mm de diamètre environ ; après agitation, de manière à les enrober au maximum de spores, on les transvase dans 10 ml d'eau distillée stérile ; on obtient ainsi une suspension de spores relativement homogène, dont on prélève 1 ml pour ensemencer 20 ml de milieu de base.

Stérilisation.

Le milieu de base est stérilisé par filtration à travers une membrane filtrante Millipore type HAWP 0500, de 0,45 µ de diamètre de pore.

Mode opératoire.

Nous utilisons pour nos essais des fioles de 100 ml à fond plat, à large ouverture ; chaque fiole reçoit aseptiquement 20 ml de milieu de base auxquels on ajoute, soit 1 ml de solution de prémélanoïdines à tester, soit 1 ml de solution témoin. Après culture dans l'étuve à 28°C, on apprécie l'état de sporulation du mycélium et on détermine son poids sec ; on dose l'acidité totale, dans certains cas, l'acidité citrique, et on identifie les différents acides accumulés dans le milieu.

b) *Méthodes de dosage*

Poids sec du mycélium.

On recueille le mycélium dans un entonnoir à verre fritté n° 2 monté sur une fiole à vide ; on le lave plusieurs fois à l'eau distillée, on le presse à la main et on le met à sécher dans une capsule tarée, pendant une nuit à l'étuve à 102°C.

Acidité.

Le liquide de lavage du mycélium, récupéré dans la fiole à vide est ajouté au milieu de culture ; le tout est complété à 100 ml. On prélève 20 ml de cette solution, dont on dose l'acidité par la soude (0,1 N) ; on détermine le virage, soit à la phénol-phtaléine pour les jus clairs, soit au pHmètre à pH = 8,3 pour les jus colorés par les prémélanoïdines.

A partir de la même solution, on fait systématiquement une chromatographie monodimensionnelle sur papier d'après la méthode de Cheftel et coll. (60), ceci afin d'identifier qualitativement les différents acides formés au cours de la fermentation. On utilise un solvant monophasique constitué d'acide formique, d'eucalyptol et de propanol, dans les proportions de 20/50/50, auquel on ajoute 50 mg de bleu de bromophénol ; le mélange est additionné d'eau — environ 12 ml — en agitant jusqu'à début de trouble. On laisse déposer à température constante (20°C), et on élimine la phase aqueuse produite par le dépôt du trouble. On dépose des taches de 50 µl sur le papier Whatman n° 1. Le chromatogramme, une fois développé après irrigation descendante de 16 h, est séché dans un endroit assez aéré au moyen d'un petit ventilateur ; en séchant, il passe du jaune au bleu par élimination de l'acide formique, seules apparaissent en jaune les taches correspondant aux acides déplacés.

Nous avons effectué également, mais seulement pour les essais destinés à la recherche d'un milieu de culture convenable pour nos souches, une séparation des acides organiques et, en particulier, de l'acide citrique par chromatographie sur colonne. De cette façon, nous avons pu déterminer un pourcentage précis d'acide citrique par rapport aux autres acides. Nous avons séparé les acides organiques contenus dans le milieu, soit par chromatographie de partage sur colonne de silice, soit par chromatographie sur colonne échangeuse d'anions. La première technique

permet, d'une part, de récupérer l'acide oxalique qui accompagne l'acide citrique quand le métabolisme du ferment se trouve légèrement dévié, d'autre part, de séparer les isomères citriques et isocitriques, fumariques et maléiques. La seconde technique est plus rapide et permet de travailler sur des quantités plus importantes que la première ; de plus, le pic de l'acide citrique, net, n'est pas perturbé par la présence éventuelle des acides minéraux ; par contre, l'acide oxalique n'est pas élué.

— *Chromatographie sur colonne de gel de silice.*

Nous avons utilisé la technique de Raveux et Bové (61) que nous rappelons succinctement. On prélève une quantité aliquote de l'échantillon à étudier, contenant au plus 1,5 méq d'acides, on filtre d'abord sur petite colonne (de 12 mm de diamètre et 200 mm de hauteur) remplie de résine Amberlite IRA 400 sous forme carbonate, à laquelle d'après Bruyant et Overeli (62) on a fait parcourir deux cycles successifs HCl (N) — CO_3Na_2 (N). Cette résine anionique retient indistinctement tous les acides et laisse filtrer le sucre restant non utilisé par le microorganisme ; après rinçage de la colonne à l'eau, les acides sont élués par 200 ml de carbonate d'ammonium à 5 p. 100. L'éluat est concentré sous vide dans un évaporateur rotatif ; on élimine ainsi le carbonate d'ammoniaque en excès. La dessiccation des sels ammoniacaux des acides est opérée sous vide en présence de potasse en pastilles et d'acide sulfurique concentré. Le résidu est alors dissous dans 0,5 ml de SO_4H_2 (5 N) ; on y ajoute 1 g de SiO_2 anhydre et on agite jusqu'à obtention d'une poudre fine. On développe ensuite soigneusement, et quantitativement, cette poudre sur une colonne contenant 8 g de silice et ayant 12 mm de diamètre et 400 mm de hauteur utile. On élue les acides organiques par action successive de solvant contenant des proportions variables de butanol tertiaire, chloroforme et acide sulfurique (0,5 N) et dont la composition est rappelée ci-après.

Les fractions de 2 ml environ sont recueillies dans des tubes à essai 200 × 20 ; elles sont titrées par la soude $\frac{N}{200}$, en présence de rouge de phénol.

TABLEAU 15

Mélanges	1	2	3	4	5	6	7
Butanol tertiaire	10,4	16,9	22	30,8	38,5	52	25
Chloroforme	119,6	113,1	88	79,2	71,5	78	25
SO_4H_2 (0,5 N)	13	13	11	11	11	13	5
Volume total	130	130	110	110	110	130	55
Volume utile après décantation et élimination de la phase aqueuse.	120	120	100	100	100	120	50

— *Chromatographie sur colonne de résine anionique.*

On fait d'abord passer une partie aliquote de l'échantillon à étudier, contenant au plus 1,5 méq d'acides, sur une colonne de Permutite 50 sous forme H^+ de 12 mm de diamètre et de 180 mm de hauteur. Cette filtration permet de retenir les acides aminés pouvant se trouver dans le milieu ; on rince la colonne à l'eau et ce filtrat passe sur une colonne de résine anionique fortement basique : Dowex 1 × 10-200-400 Mesh, sous forme de formiate de soude ; elle a été préparée en lui faisant parcourir le cycle suivant :

HCOOH (3 N)— eau —, HCl (N) — eau —, HCOONa (N) à pH = 7 ; on ajoute ce dernier jusqu'à élimination totale de Cl^-. Les acides organiques sont élués avec un gradient de concentration en acide formique de 0 à 6 N ; des fractions de 2 ml environ sont collectées dans des fioles coniques de 50 ml. On élimine l'acide formique avant la filtration en évaporant à sec dans une étude à vide à 35°C. On dissout ensuite le résidu avec une solution de rouge de phénol. Les fractions sont titrées, directement dans les fioles avec de la soude $\frac{N}{200}$.

Sporulation.

Faute de technique appropriée, véritablement satisfaisante, nous apprécions visuellement la sporulation. Dans les cas les plus intéressants, quelques reproductions photographiques donneront une idée du phénomène.

3° Résultats expérimentaux

a) *Choix des conditions de travail*

Souches.

Nous avons travaillé sur deux ferments citriques, *Aspergillus wentii* et *Aspergillus niger* ; le premier provient d'une souche utilisée industriellement, le deuxième a été isolé à l'air libre et choisi parmi cinq souches.

Milieu de base.

Nous avons adopté d'abord un milieu de culture selon Currie dont la composition en g est la suivante :

Saccharose	140
NH_4NO_3	2
KH_2PO_4	0,750
$MgSO_4(7H_2O)$	0,200
Eau	1 000 ml

Le pH est ajusté à 3,5 par addition de HCl.

Avec un tel milieu, la quantité totale d'acide produit au cours de la fermentation est faible : 10,2 millimoles dont 6 p. 100 d'acidité non citrique, avec *A. wentii* ; la plus grande partie des acides organiques autres que l'acide citrique s'est montrée constituée par de l'acide oxalique.

A. niger.

TABLEAU 16

	Acidité citrique		Poids sec du mycélium en 10^{-2} g/ml de milieu	Sporulation
	en 10^{-2} mmoles/ml de milieu	en % de l'acidité totale		
SO_4Mg $(7H_2O)$ (g/l)				
0,5	4,1	91	1,01	+++
0,25	6,5	98	1,30	++
0,20	10,2	94	1,25	+
0,10	7	90	0,80	++
PO_4H_2K (g/l)				
1	15	99	1,20	
2	8,3	90	1,40	++
2,5	6,3	91	1,20	+++
3	8	95	1,25	-
NO_3NH_4 (g/l)				
5	6	90	1,30	+++
2,5	10	95	1,00	++
3	16,2	90	1,20	+
1	7,5	91	1,10	+

\+ Mycélium peu sporulé ; ++ Mycélium moyennement sporulé ; +++ Mycélium très sporulé.

A. wentii.

TABLEAU 17

	Acidité citrique		Poids sec du mycélium en 10^{-2} g/ml de milieu	Sporulation
	en 10^{-2} mmoles/ml de milieu	en % de l'acidité totale		
SO_4Mg $(7H_2O)$ (g/l)				
0,5	5	88	1,30	+++
0,25	12	95	1,20	+
0,20	10,5	95	1,00	+
0,10	3	90	0,80	++
PO_4H_2K (g/l)				
1	10	90	0,95	++
2	15	98	1,02	+
2,5	20	99	1,30	++
3	7	89	1,10	++
NO_3NH_4 (g/l)				
5	6	90	1,40	+++
2,5	29	99	1,40	+
3	16	98	1,20	++
1	8	95	1,02	++

\+ Mycélium peu sporulé ; ++ Mycélium moyennement sporulé ; +++ Mycélium très sporulé.

Nous avons alors envisagé d'accroître le rendement en acide citrique en faisant varier la composition du milieu de base par rapport aux constituants réputés essentiels : Mg, PO_4 et NH_4. Partant du milieu de CURRIE (47), nous avons fait varier les teneurs en $MgSO_4$ ($7H_2O$), en PO_4H_2K et en NO_3NH_4, adoptant à chaque fois la concentration optimum qui donne le maximum d'acide citrique.

Nous avons remarqué au cours des expériences que souvent l'augmentation de la production d'acide citrique s'accompagne d'une modification du matelas mycélien qui devient mince et légèrement sporulé. Les tableaux 16 et 17 montrent les résultats relatifs, d'une part, au poids sec du mycélium et à son état de sporulation, d'autre part, à la production d'acide citrique exprimée en millimoles par millilitre de milieu de base et en pourcentage par rapport à l'acidité totale. Les mesures ont été faites dans la zone correspondant à la phase de l'arrêt de la croissance et de la sporulation, soit après 0 à 10 jours d'incubation. Nous avons par ailleurs testé le comportement de deux souches lorsqu'on modifie le pH initial du milieu ; nous l'avons ajusté à pH = 2,3, comme le préconisent DOELGER et PRESCOTT (48).

Nous obtenons les résultats suivants :

A. niger.

TABLEAU 18

pH	Acidité citrique		Poids sec du mycélium en 10^{-2} g/ml de milieu	Sporulation
	en 10^{-2} mmoles/ml de milieu	en % de l'acidité totale		
3,5	16,2	90	1,20	+
2,3	24,2	98	1,20	+

A. wentii.

TABLEAU 19

pH	Acidité citrique		Poids sec du mycélium en 10^{-2} g/ml de milieu	Sporulation
	en 10^{-2} mmoles/ml de milieu	en % de l'acidité totale		
3,5	29	99	1,40	+
2,3	11,2	85	1,25	+++

Il apparaît donc que le pH dépend bien de la nature des souches, ce qui rejoint les résultats de DOELGER et PRESCOTT. *Aspergillus niger* voit sa production en acide citrique augmentée, tandis que celle d'*Aspergillus wentii* se trouve diminuée de plus de 50 p. 100. Les 15 p. 100 d'acidité non citrique sont essentiellement constitués par de l'acide oxalique (photo 1).

Nous avons constaté que contrairement à *A. wentii*, *A. niger* est indifférent à la nature de la source carbonée, du moins lorsque celle-ci est représentée par le glucose ou le saccharose. Dans ces conditions, c'est le glucose que nous avons retenu comme source carbonée pour *A. niger*, pour simplifier l'expérimentation. En effet, lorsqu'au milieu de culture d'*A. wentii* à base de saccharose, en vue du rendement

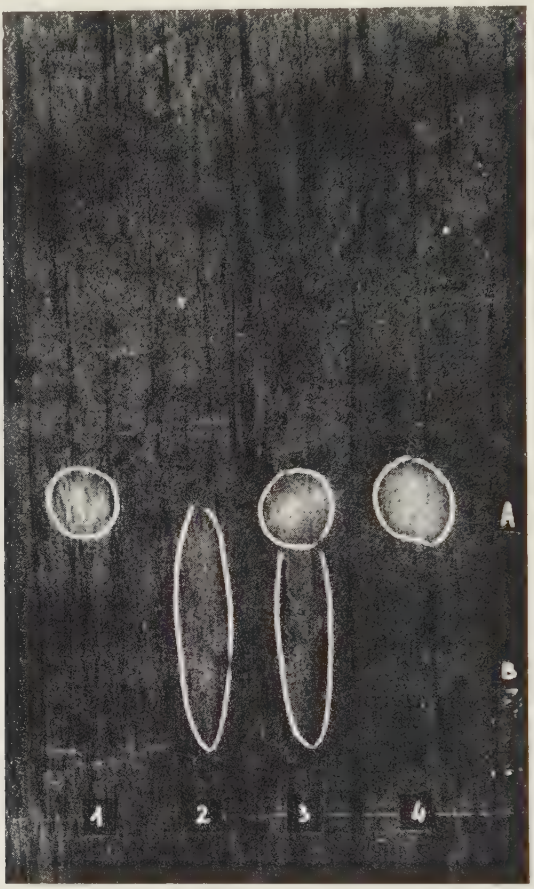


Photo 1. — *Chromatogramme obtenu par la méthode* CHEFTEL *et coll.*

Échantillon 1 : acide citrique.
Échantillon 2 : acide oxalique.
Échantillon 3 : milieu de culture à pH = 2,3
Échantillon 4 : milieu de culture à pH = 3,5.
(3 et 4 sont relatifs à *Aspergillus wentii*)

A = acide citrique. B = acide oxalique.

optimum, nous ajoutons la prise d'échantillon de prémélanoïdines, nous introduisons une certaine quantité de glucose : or, comme nous l'avons signalé précédemment et comme nous le verrons encore plus loin, celui-ci est capable de modifier la production d'acide citrique. Par contre, si nous choisissons le glucose comme source

carbonée pour *A. niger*, la quantité apportée par le milieu de base représente un tel excès par rapport à celle introduite par les prémélanoïdines que l'influence de ces dernières est négligeable.

Milieu pour *A. niger* (g)		Milieu pour *A. wentii* (g)	
Glucose	140	Saccharose	140
NO_3NH_4	3	NO_3NH_4	2,500
PO_4H_2K	1	PO_4H_2K	2,500
SO_4Mg	0,200	SO_4Mg	0,250
pH amené à 2,3 avec HCl (N)		pH amené à 3,6 avec HCl (N)	
On amène à 1 000 ml avec H_2O		On amène à 1 000 ml avec H_2O	

Milieu de conservation.

En possession de milieux de culture convenables, nous avons été en mesure de tester le milieu de conservation gélosé à partir duquel on prépare la suspension de spores. Nous nous sommes préoccupés de trois milieux de conservation :

— milieu de Czapeck (C),
— milieu de malt-agar (Difco) (M),
— milieu de composition similaire à celui du milieu de base (S).

A. niger

TABLEAU 20

	Acidité citrique		Poids sec du mycélium en 10^{-2} g/ml de milieu	Sporulation
	en 10^{-2} mmoles/ml de milieu	en % de l'acidité totale		
Milieu C	10	80	0,95	+++
Milieu M	15	99	1,15	++
Milieu S	25	98	1,25	+

A. wentii.

TABLEAU 21

	Acidité citrique		Poids sec du mycélium en 10^{-2} g/ml de milieu	Sporulation
	en 10^{-2} mmoles/ml de milieu	en % de l'acidité totale		
Milieu C	28,5	99	1,45	+
Milieu M	13,2	90	1,10	++
Milieu S	16	95	1,30	++

L'examen des résultats exposés dans les tableaux 20 et 21, toujours relatifs à l'acidité citrique et au poids sec pendant 10 jours d'incubation, montre que le milieu complet de Czapeck convient mieux à la souche d'*Aspergillus wentii*, tandis que la souche d'*Aspergillus niger* donne de meilleurs résultats avec le milieu de même composition que celui du milieu de culture.

Influence du glucose et du glycocolle.

L'ajout des différentes prémélanoïdines dans le milieu de base, introduit certaines quantités de glucose et de glycocolle, qui, dans nos conditions d'expérience (temps de chauffage compris entre 2 h. et 48 h), varient respectivement de 29,25 mg à 18,75 mg et de 70,20 mg à 30,60 mg (Cf. tabl. 1).

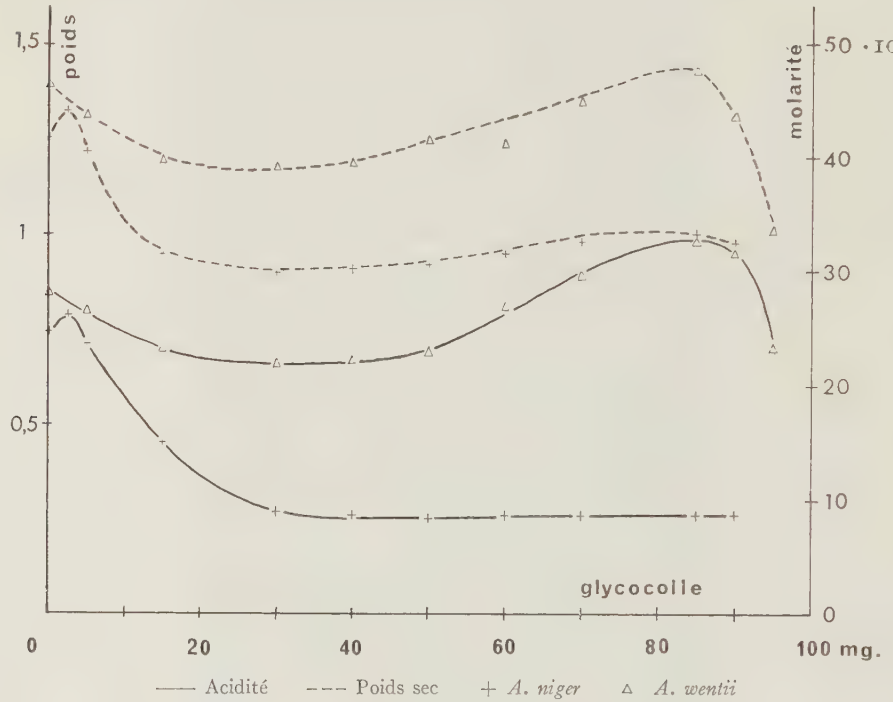


Fig. 3. — *Influence du glycocolle sur les deux souches de ferments citriques*
L'échelle de droite représente l'acidité exprimée en molarité
celle de gauche le poids sec du mycelium exprimé en 10^{-2} g/ml de milieu

Action du glycocolle

Comme nous l'avons signalé antérieurement, l'assimilation azotée et, en particulier, celle des acides aminés par les ferments citriques, est très peu connue ; par ailleurs, le glucose peut occasionnellement, quand il est ajouté à un milieu de base où la source de carbone est le saccharose, modifier le comportement des souches citriques, du moins en ce qui concerne la production d'acide. Pour toutes ces raisons, nous avons été conduits à étudier de façon systématique les répercussions de cet apport de glycocolle sur les deux souches, et de celui de glucose sur *A. wentii*.

Les courbes de la *figure 3* illustrent le comportement des deux souches en pré-

sence de doses variables de glycocolle, allant de 0 à 95 mg ; ainsi les quantités apportées par les prémélanoïdines sont largement encadrées dans la zone étudiée. En ordonnée, nous avons représenté le poids sec du mycélium récolté en grammes par millilitre de milieu de base, ou l'acidité totale en millimoles par millilitre de milieu ; celle-ci est d'ailleurs constituée essentiellement par de l'acide citrique, aucun acide organique autre que ce dernier n'ayant pu être identifié par chromatographie sur papier ; en abscisse, sont portées les quantités de glycocolle en milligrammes ajoutées au milieu de base. Les mesures ont été faites après 10 jours d'incubation à 28°C. Nous voyons que cet acide aminé a des répercussions importantes sur le comportement des deux souches. La production d'acide, par *A. wentii*, se trouve diminuée aux faibles doses, pour atteindre ensuite un maximum à 85 mg de glycocolle. Chez *A. niger*, la dose de 2,5 mg de glycocolle semble activer la production d'acide ; aux plus fortes doses, la production d'acide se trouve fortement diminuée et atteint un palier à partir de 30 mg. La courbe représentative du poids sec du mycélium a la même allure chez les deux souches, sauf pour la valeur de 2,5 mg de glycocolle qui correspond à un maximum pour *A. niger*. Signalons qu'une forte sporulation se manifeste chez *A. niger* à partir de 3 mg de glycocolle introduits dans le milieu de base, alors qu'elle n'apparaît chez la souche industrielle qu'à partir de 60 mg. (photo 2)

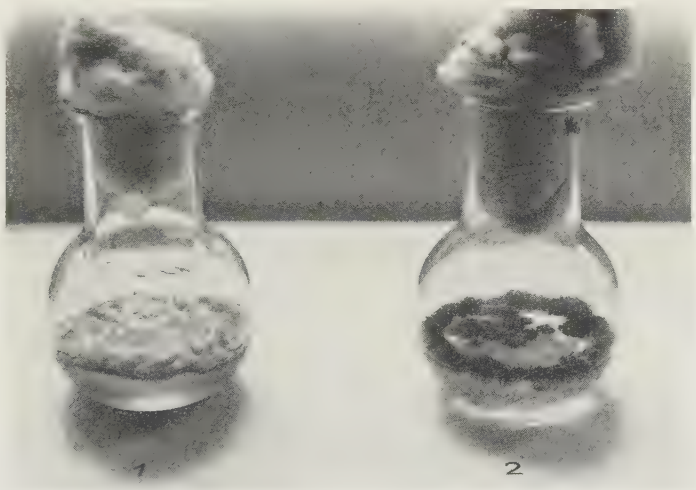


Photo 2. — *Aspergillus niger*

Fiole 1 : Milieu de base sans glycocolle.
Fiole 2 : Milieu de base contenant 3 mg de glycocolle.

Action du glucose.

Nous avons étudié son influence sur *A. wentii* dans la zone correspondant aux quantités de glucose pouvant être éventuellement apportées par les préparations de prémélanoïdines dans le milieu de culture. Nous avons rassemblé les résultats obtenus dans le tableau 22. Les mesures ont été également faites après 10 jours d'incubation.

Nous voyons que les productions d'acide et de mycélium sont peu affectées par la présence du glucose, et que ce dernier aurait une légère tendance à exalter la sporulation.

TABLEAU 22

Glucose en mg	Acidité en 10^{-2} mmoles/ml	Poids en 10^{-2} g/ml	Sporulation
0	28,3	1,30	+
10	27,3	1,26	++
25	25,6	1,23	++
50	25	1,30	++
75	26,6	1,27	++

Il résulte de cette étude de l'influence du glycocolle et du glucose sur les deux souches que, à chaque essai, nous avons dû réaliser un témoin particulier recevant les quantités de glucose et de glycocolle rigoureusement égales à celles introduites ainsi dans les essais par les différentes prémélanoïdines.

b) *Action des différentes prémélanoïdines*

Avant d'exposer les résultats, présisons la forme générale de courbe de croissance et de production d'acide citrique. Les courbes de la *figure* **4** montrent, à titre d'exemple, pour les deux souches, l'évolution au cours du temps de l'acidité citrique exprimée en millimoles par millilitre de milieu de base, et celle du poids sec de mycélium récolté, exprimé en grammes par millilitre de milieu de base. Elles se rapportent à des cultures dans lesquelles on n'a ajouté ni prémélanoïdines ni mélange témoin glucose-glycocolle. Dans leurs parties moyennes, les courbes d'acidité et de poids sec sont pratiquement confondues avec une droite : les vitesses de croissance et de production d'acide peuvent être mesurées par la pente de cette droite. L'appréciation des modifications apportées au comportement de ces microorganismes, en présence de prémélanoïdines, a donc été faite, d'une part, dans l'intervalle où la croissance et la production d'acide citrique sont proportionnelles au temps, d'autre part, pendant la phase où la croissance et l'acidité ne sont plus modifiées. Les tableaux 23 à 26 exposent les résultats obtenus avec les différentes prémélanoïdines. Nous y avons porté :

— les vitesses V et U relatives respectivement à la production d'acide et à la croissance pendant la phase linéaire ;

— les valeurs A et P qui sont respectivement les quantités d'acide produit en fin de fermentation, exprimées en millimoles par millilitre et le poids sec de mycélium récolté en fin de croissance, exprimé en grammes par millilitre ;

— les valeurs des rapports $\frac{V}{V_T}$ et $\frac{U}{U_T}$ où V est la vitesse de production d'acide, exprimée en millimoles par millilitre et par jour ; U est la vitesse de production de mycélium, exprimée en grammes par millilitre et par jour ; V_T et U_T sont les valeurs correspondantes dans l'essai témoin ;

— les valeurs des rapports $\frac{A}{A_T} = r$ et $\frac{P}{P_T} = q$ relatives respectivement à l'acidité développée et au poids de mycélium formé, aux mêmes quantités mesurées dans le milieu de fermentation témoin.

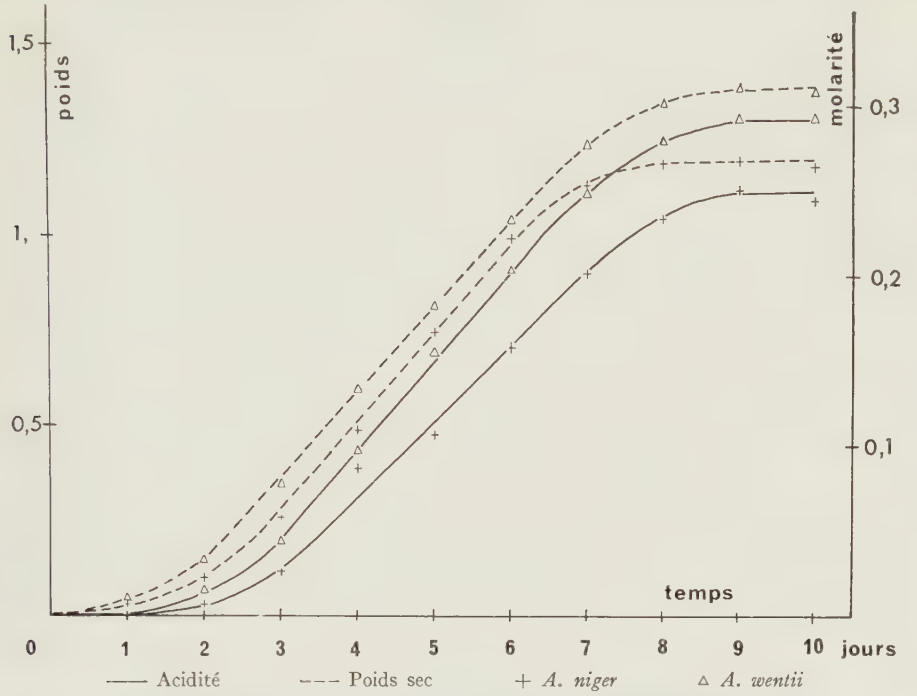


FIG. 4. — *Croissance et production d'acide citrique*
L'échelle de droite représente l'acidité exprimée en molarité
celle de gauche le poids sec en 10^{-2} g/ml

— *A. Niger*

TABLEAU 23

Acidité

Temps de réaction en heures	2		8		24		48	
	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai
V	1,65	1,30	1,70	1,25	2	1,02	2	1
$\frac{V}{V_T}$	0,78		0,73		0,51		0,50	
A	9,9	7,30	9,95	7,10	10,1	6,2	10,2	6
r	0,74		0,71		0,61		0,59	

On constate que :

— pour *A. niger*, les différentes prémélanoïdines ralentissent sensiblement la vitesse de production ou d'accumulation d'acide citrique et ceci dès les premiers stades de la réaction de MAILLARD, puisqu'une préparation de 2 heures a déjà

TABLEAU 24

Poids sec

Temps de réaction en heures	2		8		24		48	
	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai
U	0,22	0,27	0,21	0,28	0,20	0,20	0,21	0,21
$\frac{U}{U_T}$	1,22		1,33		1,00		1,00	
P	0,90	1,15	0,90	1,20	0,91	1,01	0,91	1,02
q	1,27		1,33		1,11		1,12	
Sporulation	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

— *A. wentii.*

TABLEAU 25

Acidité

Temps de réaction en heures	2		8		24		48	
	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai
V	3,83	5,30	3,80	4,50	3,80	3,80	3,85	2,60
$\frac{V}{V_T}$	1,38		1,18		1,00		0,67	
A	24,5	31	24	28	25,6	25,5	26	17
r	1,26		1,07		0,99		0,65	

un effet dépressif net. Par contre, on voit une importante exaltation de la production de mycélium ; cette influence passe d'ailleurs par un maximum en fonction du temps de réaction : une préparation de 8 heures est plus active que celle de 2 heures, celles de 24 heures et de 48 heures n'ont plus d'activité ;

— pour ce qui est d'*A. wentii*, il répond aux prémélanoïdines soit par une activation aux temps de chauffage les plus courts, soit par une inhibition pour les prémélanoïdines de plus longue durée ; alors que les valeurs de l'acidité décroissent cons-

TABLEAU 26

Poids sec

Temps de réaction en heures	2		8		24		48	
	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai	témoin	essai
U	0,21	0,22	0,20	0,25	0,21	0,22	0,20	0,18
$\frac{U}{U_T}$	1,04		1,25		1,04		0,90	
P	1,27	1,35	1,20	1,40	1,20	1,25	1,10	0,90
q	1,06		1,17		1,04		0,81	
sporulation	+	+	+	+	+	+++	+	+++

tamment, celles relatives au mycélium formé passent par un maximum assez peu marqué. Les prémélanoïdines de 24 heures et de 48 heures favorisent la sporulation du mycélium. (photo 3).

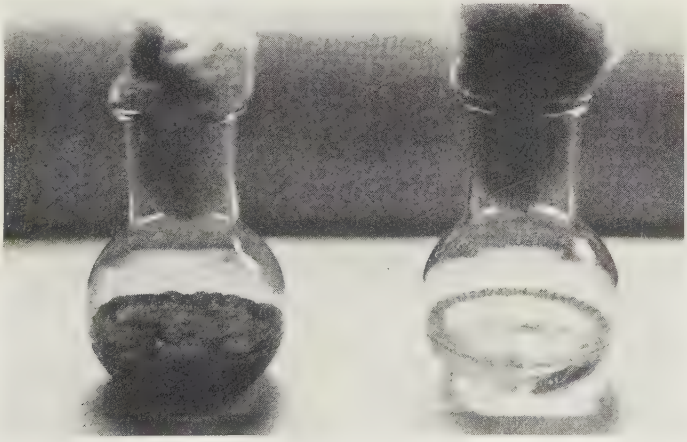


Photo 3. - *Aspergillus wentii après 3 jours d'incubation*
A gauche : La préparation de 48 h favorise la sporulation du mycélium.
A droite : Témoin.

De plus, nous avons remarqué que les prémélanoïdines ne déviaient pas le métabolisme des ferments citriques puisque nous n'avons décelé aucun autre acide organique par chromatographie sur papier, à l'exclusion de l'acide citrique.

c) *Influence de la concentration des prémélanoïdines*

Comme pour les microorganismes précédents, nous avons étudié les possibilités d'action des prémélanoïdines à très faibles doses. Dans les tableaux 27 à 30 sont rassemblés les résultats obtenus. Les grandeurs représentées sur ces tableaux

— *A. niger.*

TABLEAU 27

Acidité

Prémélanoïdines de	Dilutions					
	1	10	10^2	10^3	10^4	∞
2 heures.....	0,74	1,05	1,06	1,20	1,07	1
8 heures.....	0,71	0,90	0,97	1,15	1,22	1
24 heures.....	0,61	0,70	0,85	1,00	1,15	1
48 heures.....	0,59	0,65	0,90	0,95	1,05	1

TABLEAU 28

Poids sec

Prémélanoïdines de	Dilutions					
	1	10	10^2	10^3	10^4	∞
2 heures.....	1,27	1,26	1,22	1,05	1,00	1
8 heures.....	1,33	1,15	1,17	1,08	1,02	1
24 heures.....	1,11	1,10	1,00	1,00	1,00	1
48 heures.....	1,12	1,09	0,97	1,00	1,00	1

— *A. wentii*

TABLEAU 29

Acidité

Prémélanoïdines de	Dilutions					
	1	10	10^2	10^3	10^4	∞
2 heures.....	1,26	1,05	1,06	1,20	1,02	1
8 heures.....	1,07	1,04	1,10	1,23	1,00	1
24 heures.....	0,99	1,15	1,20	1,10	1,05	1
48 heures.....	0,65	0,94	1,12	1,03	1,00	1

sont les valeurs du rapport r et q de l'acidité développée ou du poids sec du mycélium formé, aux mêmes quantités mesurées par le milieu de fermentation témoin. Ayant observé que les rapports d'activité relatifs aux productions globales, varient dans le même sens que ceux relatifs aux vitesses, il nous a été plus facile de faire les mesures seulement dans la zone correspondant à la phase de l'arrêt de la croissance et de la production d'acide.

TABLEAU 30

Poids sec

Prémélanoïdines de	Dilutions					
	1	10	10^2	10^3	10^4	∞
2 heures.....	1,06	0,95	0,90	0,96	1,05	1
8 heures.....	1,17	1,10	1,03	1,00	1,00	1
24 heures.....	1,04	1,00	0,98	1,03	1,03	1
48 heures.....	0,81	1,05	1,06	1,00	1,00	1

On voit que pour *A. niger* la production d'acide citrique, qui est inhibée par les prémélanoïdines à concentration maximum, cède la place à une activation d'environ 20 p. 100 lorsque la solution initiale est diluée 10 000 fois ; c'est le cas surtout des prémélanoïdines à faible temps de chauffage. Inversement, la production de mycélium est surtout favorisée aux concentrations les plus fortes.

Pour *A. wentii*, le rapport r relatif à la production d'acide citrique, toujours supérieur à 1, sauf pour les prémélanoïdines de 24 heures, sans dilution, et, pour celles de 48 heures non diluées et à la dilution 10, passe par un maximum net pour une dilution 1 000 des prémélanoïdines de 24 heures et de 48 heures.

Il est à noter que ces observations sont semblables à celles rapportées par Sheikh (13) dans le cas des levures.

Le rapport q relatif au poids sec est très peu modifié, la dilution des prémélanoïdines n'affecte pas la production de mycélium.

Deuxième Partie

ACTION DES PRÉMÉLANOÏDINES SUR DIFFÉRENTS ENZYMES

Introduction

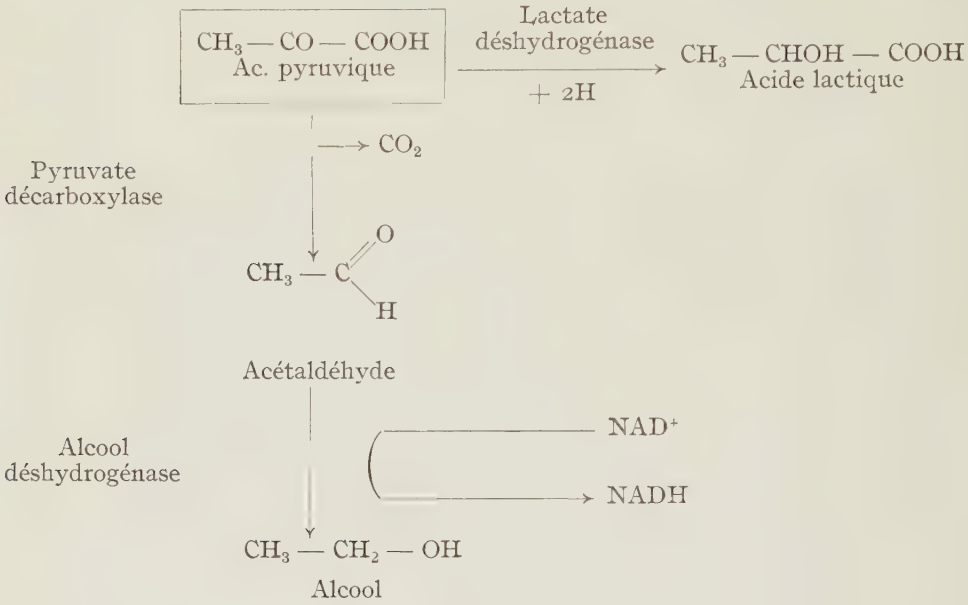
L'ensemble des résultats obtenus avec les différents microorganismes étudiés nous permet de dire que, malgré la diversité parfois déroutante des phénomènes observés, l'action des prémélanoïdines semble assez générale : mise en évidence chez les levures, elle apparaît également chez d'autres types de microorganismes, moisissures ou bactéries. Les répercussions enregistrées ont porté essentiellement sur les vitesses de réactions métaboliques : vitesse de dégagement de CO_2 pour les levures, étudiée par SHEIKH (13), vitesse de biosynthèse et de production d'acide pour les ferments citriques et lactiques. Dans de rares cas, nous avons noté une action positive sur la quantité totale de produits formés. Toutes ces observations nous conduisent à émettre l'hypothèse qu'effectivement les produits résultant du chauffage des solutions de glucose et de glycocolle peuvent exercer un effet, soit activateur, soit inhibiteur, sur les réactions enzymatiques responsables du métabolisme des différents microorganismes examinés, et viennent ainsi accroître la liste des effecteurs — activateurs, inhibiteurs — déjà connus. De plus, la similitude des courbes d'activité *in vivo*, en fonction des dilutions des prémélanoïdines dans le cas de deux microorganismes tels que la levure et les ferments citriques, donne à penser que les prémélanoïdines pourraient agir sur un enzyme intervenant dans une phase commune de la dégradation du glucose ; il est vrai qu'une telle similitude n'a pas été observée chez les trois *Lactobacillus* étudiés, bien qu'il soit admis qu'ils ont le même métabolisme du glucose jusqu'au stade de la formation du pyruvate. C'est ce pyruvate qui a retenu d'abord notre attention, du fait qu'il est un de ces éléments communs, jouissant même d'une position particulière puisqu'il se trouve situé dans la chaîne de réactions au point où bifurquent les voies empruntées par chacun des trois types de fermentation auxquels nous nous sommes intéressés.

Nous nous sommes donc proposé de voir d'abord dans quelle mesure les enzymes admettant pour substrat le pyruvate pourraient être affectés *in vitro* par la présence de prémélanoïdines dans leur milieu de réaction.

Bien sûr, d'autres hypothèses pourraient être tout aussi bien envisagées, en particulier, celle d'une intervention sur les enzymes participant à la glycolyse. Il nous a semblé préférable d'aborder cette question par l'étude des systèmes enzymatiques les plus proches du stade de production des produits terminaux du métabolisme que nous avions dosés.

Nous avons entrepris, en premier lieu, dans cette seconde partie du travail, la séparation et la purification de la pyruvate décarboxylase de la levure, agent responsable du dégagement de CO_2 dans la fermentation. D'autres enzymes, tels

que l'alcool déshydrogénase, la lactate déshydrogénase, agissent en des points situés au voisinage immédiat du point d'intervention de la décarboxylase et ainsi leur activité peut conditionner la vitesse de dégagement de CO_2. De plus, évidemment une activité lactico-déshydrogénasique intervient dans le processus de production d'acide lactique par les ferments lactiques. Pour toutes ces raisons, nous



SCHÉMA

avons été conduits à faire une étude systématique de l'influence des prémélanoïdines sur ces enzymes. Nous nous sommes également proposé d'extraire la pyruvodécarboxylase oxydative à partir de ferments citriques, et de tester son comportement en présence de prémélanoïdines, puisque cet enzyme régit la décarboxylation oxydative de l'acide pyruvique en acide acétique engagé partiellement dans l'acétyl coA initiateur du cycle de Krebs (Cf. schéma, p. 36).

1° La pyruvate décarboxylase (E. C. : 1. 1. 1. 2)

a) *Préparation*

Nous avons utilisé la méthode de Green (63), appliquée d'abord à la levure de brasserie, selon la technique initiale, que nous rappelons brièvement :

La levure de bière est lavée plusieurs fois à l'eau, essorée et mise à sécher sous ventilation à température ambiante (20°C).

— A 100 g de levure, on ajoute 300 ml de tampon phosphate M/15 à pH = 7,2 ; on agite jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène, on laisse autolyser pendant 1 heure à l'étuve, à 37°C. On ajoute ensuite 400 ml d'eau distillée. Après centrifugation, on obtient un extrait total A (530 ml).

— On ajoute à cet extrait 80 ml de tampon phosphate 0,5 M, à pH = 7,2 et 40 ml d'acétate de calcium (1 M) ; il se forme un précipité abondant que l'on sépare par centrifugation. On récupère le surnageant et on complète son volume à 700 ml avec l'eau de lavage du précipité.

— A cette solution, on ajoute 266 g de sulfate d'ammonium (38 g par 100 ml de solution). Le précipité récupéré après centrifugation est dissous dans 300 ml de tampon citrate (0,04 M), à pH = 6.

— La solution obtenue est soumise à une précipitation dans les mêmes conditions que précédemment : on ajoute 114 g de sulfate d'ammonium (38 g par 100 ml de solution). Le précipité est séparé par centrifugation, puis redissous dans 126 ml de même tampon citrate (0,04 M), à pH = 6.

— Cette solution (162 ml) est environ à 11 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium. On lui fait subir une série de précipitations fractionnées ; le degré de saturation est réalisé à chaque stade figurant au tableau ci-dessous qui reproduit les données essentielles du travail de GREEN.

TABLEAU 31

Opérations	Degré de saturation
I	0,35
II	0,42
III	0,52
III*a*	0,47
III*b*	0,52
IIIb_1	0,47
IIIb_2	0,53

Les précipités I et II sont éliminés : le précipité III, résultat d'une précipitation en milieu à 52 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium est redissous dans 200 ml de tampon citrate (0,05 M), pH = 6, au quart de saturation en sulfate d'ammonium ; on rejette le précipité III*a*, et on garde III*b* qu'on reprend avec 200 ml de tampon citrate (0,05 M), pH = 6, au quart de saturation en sulfate d'ammonium. La solution est fractionnée de nouveau ; on garde IIIb_2 où se trouve concentrée notamment l'activité décarboxylasique.

GREEN chiffre l'efficacité de la purification par la valeur du rapport :

$$R = \frac{\text{Densité optique à 280 m}\mu}{\text{Activité décarboxylasique (exprimée en unités décarboxylase/ml)}}.$$

Cette unité décarboxylase est définie comme la quantité d'enzyme qui catalyse la production de 100 µl de CO_2 en 3 minutes, à 30°C. Nous décrirons plus loin le protocole expérimental détaillé. A titre d'exemple, la valeur de R est de 13 pour la fraction 1 et de 0,78 pour la fraction IIIb_2.

Nous avons appliqué cette technique à l'extraction de la pyruvate décarboxylase de la levure de boulangerie. Les fractions obtenues à partir de précipitations fractionnées nous donnaient les rapports d'activité suivants :

TABLEAU 32

Opérations	Degré de saturation	R
I	0,35	15,80
II	0,42	1,20
III	0,52	2,70
III*a*	0,47	2,00
III*b*	0,52	2,30
IIIb_1	0,47	1,80
IIIb_2	0,53	pas de précipité

Nous voyons donc que, contrairement à la levure de bière, où la décarboxylase se trouve concentrée dans la fraction précipitable à 52 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium, celle de la levure de boulangerie se trouve concentrée dans la fraction précipitant à 42 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium. De plus, on n'obtient plus de précipité à la fraction IIIb_2 ; nous avons alors recherché les conditions optimales de fractionnement valables pour la décarboxylase de la levure de boulangerie. Les degrés de saturation utilisés pour les précipitations fractionnées se trouvent rassemblés dans le tableau ci-dessous où nous avons également fait figurer les rapports d'activité relatifs à chaque fraction.

TABLEAU 33

Opérations	Degré de saturation	R
I	0,35	15,80
II	0,42	1,20
II*a*	0,37	2,10
II*b*	0,42	0,80
IIa_1	0,35	1,25
IIb_1	0,42	0,68

Là encore, nous voyons que le critère de pureté passe de 15,80 (pour la fraction I) à 0,68 (pour II b_1).

b) *Dosage d'activité*

Deux techniques de dosage peuvent être utilisées, l'une basée sur la mesure de la vitesse de dégagement de CO_2, l'autre sur le dosage de l'acétaldéhyde.

Dégagement de CO_2.

On détermine directement la cinétique de dégagement de CO_2 au micro-Warburg par action de l'extrait enzymatique sur une solution de pyruvate de sodium. L'extrait utilisé est préalablement dilué de façon telle que l'on se trouve dans des conditions où la quantité d'enzyme est le facteur limitant de la réaction ; ceci est réalisé lorsqu'on est en présence de 0,5 unité décarboxylase provoquant un dégagement de 50 µl en 3 minutes. La quantité de pyruvate utilisée doit être suffisante pour que l'enzyme soit saturé.

On introduit dans la fiole :

0,3 ml de tampon citrate 0,5 M, pH = 6 ;
0,7 ml d'extrait enzymatique ;
0,5 ml d'eau distillée ;
0,5 ml de prémélanoïdines ou de témoin glucose-glycocolle ;

et, dans le diverticule :

0,5 ml de pyruvate de sodium 1 M.

Après mise en équilibre à 30°C, on mélange le contenu du diverticule à celui de la fiole et l'on fait des lectures toutes les dix minutes.

Dosage de l'acétaldéhyde.

Il est basé sur le fait que l'acétaldéhyde résultant de la décarboxylation du pyruvate est réduit en éthanol, en présence d'alcool déshydrogénase dont le co-enzyme à la nicotinamide, NADH, est oxydé en NAD^+. On a suivi cette oxydation au spectrophotomètre Spectronic 505, à 340 mµ. Dans notre cas, nous n'avons pas eu à ajouter d'alcool déshydrogénase dans l'extrait enzymatique car, à côté de la pyruvate décarboxylase, se trouve — quelque soit le degré de pureté de celle-ci — une activité alcool déshydrogénasique suffisamment importante.

Les conditions de dosage sont les suivantes :

1 ml d'extrait enzymatique ;
0,2 ml de pyruvate de sodium 1 M ;
0,5 ml d'eau distillée ;
0,2 ml de NADH $0{,}15 \times 10^{-2}$ M, soit 92 mg/100 ml d'eau ;
1 ml de prémélanoïdines ou de témoin glucose-glycocolle.

Nous n'avons pu expérimenter qu'avec des préparations à temps de chauffage court, ou à des dilutions très fortes de préparations plus poussées en raison de l'absorption intense de ces composés dans le visible et surtout dans l'UV.

c) *Action des prémélanoïdines*

Nous avons étudié l'action des prémélanoïdines aux deux stades extrêmes de la préparation de cet enzyme : dans l'extrait initial A et dans le précipité II b_1 redissous dans un tampon citrate à pH = 6. Le tableau 34 expose les résultats obtenus

avec les différentes prémélanoïdines. Nous y avons représenté les valeurs de $\frac{V}{V_T}$ où V est la vitesse de dégagement du CO_2 en µl par minute et V_T la vitesse du témoin exprimée dans les mêmes unités.

TABLEAU 34

Prémélanoïdines de		2 h	8 h	24 h	48 h
$\frac{V}{V_T}$	Extrait initial	1,15	1,25	1,40	1,50
	Extrait IIb_1	1,08	1,12	1,15	1,20

FIG. 5. — *Action de la préparation de prémélanoïdines 48 h sur la pyruvate décarboxylase*

Les courbes de la *figure 5* montrent l'allure de la décarboxylation témoin et celle de la décarboxylation en présence de prémélanoïdines 48 h avec l'extrait initial A.

Deux constatations s'imposent :

— d'une part, les prémélanoïdines sont nettement activatrices, et les effets signalés sont proportionnels au temps de chauffage de celles-ci ;

— d'autre part, l'influence des prémélanoïdines va en diminuant avec le degré de purification de la pyruvate décarboxylase.

d) *Action des concentrations de prémélanoïdines*

Nous avons cherché à préciser les limites de concentration au-delà desquelles les prémélanoïdines n'ont plus d'influence. Dans les tableaux 35 et 36, nous avons fait figurer les valeurs des rapports $\frac{V}{V_T}$ en fonction des dilutions de prémélanoïdines agissant sur les extraits A et II b_1.

TABLEAU 35

Extrait A

Prémélanoïdines de	Dilutions					
	1	2	10	10^2	10^3	∞
2 heures.....	1,15	1,15	1,10	1,03	1,00	1,00
8 heures.....	1,25	1,25	1,21	1,08	1,05	1,00
24 heures.....	1,40	1,40	1,30	1,15	1,07	1,00
48 heures.....	1,50	1,50	1,32	1,20	1,12	1,00

TABLEAU 36

Extrait II b_1

Prémélanoïdines de	Dilutions					
	1	2	10	10^2	10^3	∞
2 heures.....	1,08	1,08	1,05	1,00	1,00	1,00
8 heures.....	1,12	1,12	1,10	1,06	1,00	1,00
24 heures.....	1,15	1,15	1,13	1,09	1,03	1,00
48 heures.....	1,20	1,20	1,15	1,11	1,08	1,00

On constate que l'activation de la pyruvate décarboxylase varie dans le même sens que les concentrations des prémélanoïdines au-delà de la dilution 2.

Nous avons cherché à voir si les cinétiques d'action enzymatique, avec et sans prémélanoïdines, suivaient ou non la loi simple de HENRI et MICHAELIS (04, 05). Pour cela, on fait varier la concentration en pyruvate, toutes choses étant égales

d'ailleurs, et pour chaque concentration de ce substrat, on relève les courbes représentant les quantités de CO_2 dégagées en fonction du temps ; on mesure les vitesses initiales et, selon la représentation de Lineweaver-Burk (66), on trace la variation de $\frac{I}{V}$ en fonction de $\frac{I}{S}$ (V = vitesse initiale et S = concentration en substrat). Si la combinaison enzyme-substrat suit la loi de Henri et Michaelis, on obtient ainsi une droite dont l'ordonnée à l'origine $\left(\frac{I}{V_M}\right)$ et la pente α permettent de calculer la constante de Michaelis, ... $K = \alpha V_M$; on sait que l'affinité est chiffrée par l'inverse de cette constante.

Les courbes 6 montrent ce qu'il en est, sans addition de prémélanoïdines, pour la décarboxylase non purifiée et la décarboxylase récupérée, après précipitation fractionnée : la première ne suit pas la loi de Henri et Michaelis, la seconde agit selon le schéma classique. La purification de l'extrait initial entraîne donc la perte des anomalies cinétiques de l'enzyme. Deux explications peuvent en être données :

— l'allure de la courbe obtenue avec l'enzyme natif dans la représentation de Lineweaver-Burk (66) constitue une propriété intrinsèque de l'enzyme ; dans ces conditions le traitement qu'on lui a fait subir a modifié profondément son comportement cinétique ;

— cette forme exceptionnelle de courbe est la conséquence de la présence de corps étrangers, activateurs ou inhibiteurs, à côté de l'enzyme.

Nous avons étudié l'influence des différentes prémélanoïdines sur la cinétique d'action enzymatique, et calculé chaque fois qu'il a été possible la valeur de K_m correspondante. Le tableau 37 expose les résultats obtenus avec les deux extraits enzymatiques (A et IIb_1).

TABLEAU 37

Valeurs de K_m exprimées en moles

Prémélanoïdines de	2 h	8 h	24 h	48 h
Extrait A	$15 \cdot 10^{-8}$	$10{,}3 \cdot 10^{-8}$	$6{,}5 \cdot 10^{-8}$	$5{,}2 \cdot 10^{-8}$
Extrait II b_1	$4{,}5 \cdot 10^{-8}$	$4{,}1 \cdot 10^{-8}$	$3{,}9 \cdot 10^{-8}$	$3{,}8 \cdot 10^{-8}$

La présence de prémélanoïdines dans le milieu de réaction entraîne donc les modifications suivantes :

— L'extrait enzymatique non purifié suit la loi de Henri et Michaelis : dans la *figure 6*, nous avons représenté la droite obtenue avec les prémélanoïdines 48 h. Les valeurs de K_m sont d'autant plus faibles que le temps de préparation des prémélanoïdines est plus long.

— Avec l'extrait enzymatique purifié, les variations de K_m sont moins nettes : la valeur de K_m initialement égale à $4{,}7 \cdot 10^{-8}$ M (sans prémélanoïdines) se trouve réduite à la valeur de $3{,}8 \cdot 10^{-8}$ M en présence de la préparation la plus active, 48 h.

e) *Hypothèses et Vérifications*

Pour expliquer le mécanisme d'action des prémélanoïdines sur la pyruvate décarboxylase, nous avons examiné plusieurs hypothèses de travail.

On sait que l'acétaldéhyde, qui est un inhibiteur de la décarboxylase, a un groupement carbonyle très réactif ; aussi, avons-nous pensé qu'il serait susceptible de se combiner à d'autres composés présents dans les prémélanoïdines : dans ces conditions, son action inhibitrice serait stoppée, et en même temps son spectre d'absorption se trouverait modifié. Nous avons donc relevé d'une part le spectre

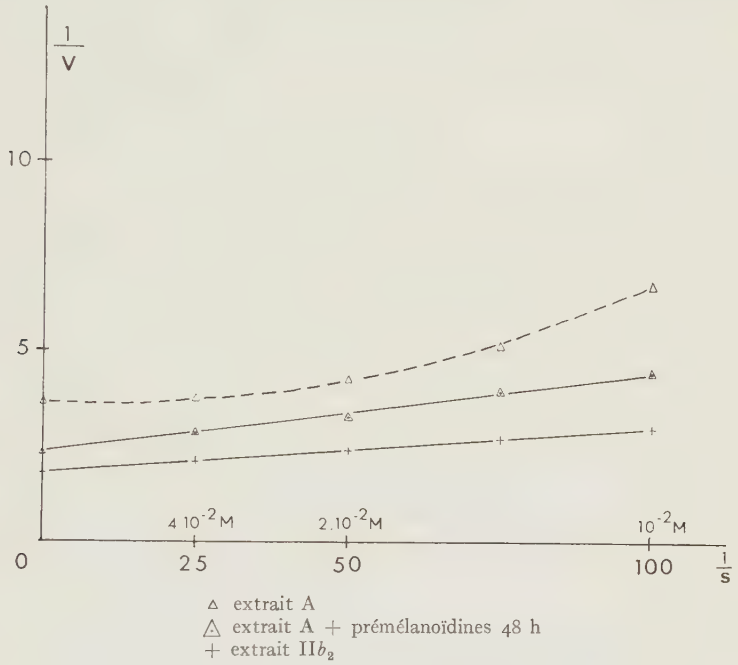


FIG. 6. — *Cinétique d'action de la pyruvate décarboxylase*

d'absorption entre 230 et 340 mμ d'une solution pure d'acétaldéhyde (Max. à 277 mμ) et d'autre part, le spectre d'une solution à la même concentration finale en acétaldéhyde et dans laquelle on a ajouté 1 ml d'une préparation de prémélanoïdines diluée. Pour compenser l'absorption des produits de la réaction de MAILLARD, nous avons mis la même quantité de prémélanoïdines dans la cuve de référence. On constate que les deux spectres se superposent ; l'existence d'un composé d'addition entre acétaldéhyde et prémélanoïdines est donc peu vraisemblable. Il est vrai que nous avons été obligé d'expérimenter sur des dilutions importantes de prémélanoïdines, et, qu'à ces dilutions, la pyruvate décarboxylase est peu activée. De plus, si les prémélanoïdines jouent effectivement le rôle d'anti-inhibiteurs vis-à-vis de l'acétaldéhyde, il suffirait de fixer ce dernier pour lever l'inhibition, et l'action des prémélanoïdines deviendrait

donc nulle. Nous avons neutralisé l'action de l'acétaldéhyde par une solution de bisulfite de sodium (0,5 M).

Les essais réalisés peuvent être schématisés ainsi :

I Substrat + Enzyme.
II Substrat + Enzyme + Bisulfite (B).
III Substrat + Enzyme + Prémélanoïdines (PM).
IV Substrat + Enzyme + Prémélanoïdines (PM) + Bisulfite.

Les courbes de la *figure 7* montrent les résultats obtenus :

— Le bisulfite améliore, sans aucun doute, l'activité décarboxylasique, en bloquant l'acétaldéhyde au cours de sa formation.

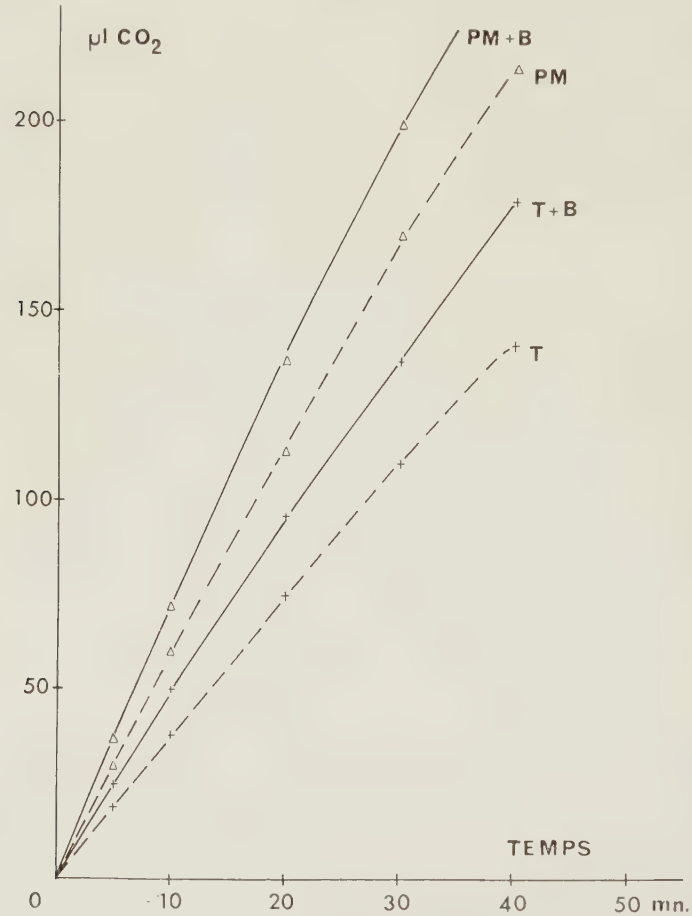


FIG. 7. — *Action du bisulfite et des prémélanoïdines sur l'activité de la pyruvate décarboxylase*

— L'influence des prémélanoïdines n'est pas modifiée par la présence du bisulfite.

Il ressort de ces observations que les prémélanoïdines ont une action vraisemblablement indépendante de l'acétaldéhyde accumulé au cours de la réaction.

Dans le même esprit on aurait pu penser que les prémélanoïdines intervenaient en activant la déshydrogénase alcoolique qui aurait alors réduit plus rapidement l'acétaldéhyde. Nous avons alors regardé dans quelles mesures l'activité de l'alcool déshydrogénase se trouve affectée par la présence de produits de la réaction de MAILLARD. Nous avons expérimenté sur trois extraits enzymatiques : l'extrait initial A, l'extrait IIb_1 contenant suffisamment d'alcool déshydrogénase, et une préparation commerciale (Sigma, nº 340-26).

Le dosage repose sur le fait que l'oxydation de l'alcool éthylique en acétaldéhyde s'accompagne d'une réduction du NAD^+ en NADH. Nous avons suivi cette réduction à 340 mμ.

Les conditions d'expérience sont les suivantes :

Dans la cuve du spectrophotomètre, on met :

— 1 ml de pyrophosphate de sodium 0,06 M, pH = 8,5 ;

— 0,5 ml de NAD^+ 0,15 × 10^{-2} M, soit 91 mg dans 100 ml d'eau distillée ;

— 0,2 ml d'extrait enzymatique ;

— 0,3 ml d'alcool 95 p. 100 non dénaturé ;

— 1 ml de prémélanoïdines ou de témoin.

Là encore, comme précédemment, nous sommes limités par la forte absorption des prémélanoïdines ; seules les préparations de 2 h et de 8 h ont été testées sans dilution ; celles de 24 h et de 48 h l'ont été après avoir été diluées 100 fois.

L'influence des prémélanoïdines sur l'alcool déshydrogénase s'est révélée nulle, à tous les stades de purification.

L'activation de la pyruvate décarboxylase paraît donc devoir être rattachée à d'autres hypothèses ; on peut penser, en particulier, que les prémélanoïdines exerceraient un rôle antagoniste vis-à-vis d'inhibiteurs de nature protéique, accompagnant l'enzyme dans son milieu naturel. Dans ce but, nous avons tenté de pousser plus loin la purification de l'extrait enzymatique IIb_1, par filtration sur Sephadex. Cette technique efficace dans le fractionnement des grosses molécules protéiques, par tamisage moléculaire, n'a pas encore été utilisée, à notre connaissance, dans la purification des extraits décarboxylasiques.

La colonne de Sephadex G 200 (140-400 Mesh), de 55 cm de hauteur et de 1,5 cm de diamètre, contient 3,5 g de produit sec, préalablement mis à gonfler dans le tampon citrate 0,04 M, pH = 6. On introduit une prise d'essai de 2 ml de l'extrait IIb_1 (environ 60 mg de matière sèche). La colonne est rincée par la solution de tampon citrate 0,04 M. L'effluent est recueilli par fractions de 5 ml. La composition protéique est évaluée par mesure d'absorption à 280 mμ.

Nous représentons sur la *figure 8* la courbe d'élution de la colonne par le tampon citrate, et, parallèlement, la répartition dans les différentes fractions des activités de la décarboxylase et de l'alcool déshydrogénase, exprimées en pourcentage de l'activité maximum. Étant donné que les poids moléculaires de ces enzymes sont très voisins, les répartitions de leurs activités sont identiques : dans les tubes 14 à 16 se trouvent concentrées à la fois la pyruvate décarboxylase et l'alcool déshydrogénase.

Comme en cours d'opération il se produit une séparation entre l'apo-enzyme et le co-enzyme de la décarboxylase, sans doute due à un phénomène de dialyse, nous avons été obligés de supplémenter le filtrat en pyrophosphate de thiamine (Sigma) et en chlorure de magnésium, pour tester l'activité de celle-ci.

Le tracé de la courbe d'élution montre, à côté du pic principal (P_1), un contrefort (P_2) (fractions 20 à 25), et un autre pic (P_3) (fraction 45 à 48).

Nous avons d'abord étudié l'action des prémélanoïdines sur le contenu des tubes 14 à 16 où se trouve localisée la pyruvate décarboxylase. Cette influence s'est révélée nulle ; de plus, la valeur de K_m n'est pas affectée : elle est égale à $3{,}3 \cdot 10^{-8}$M avec et sans addition de prémélanoïdines.

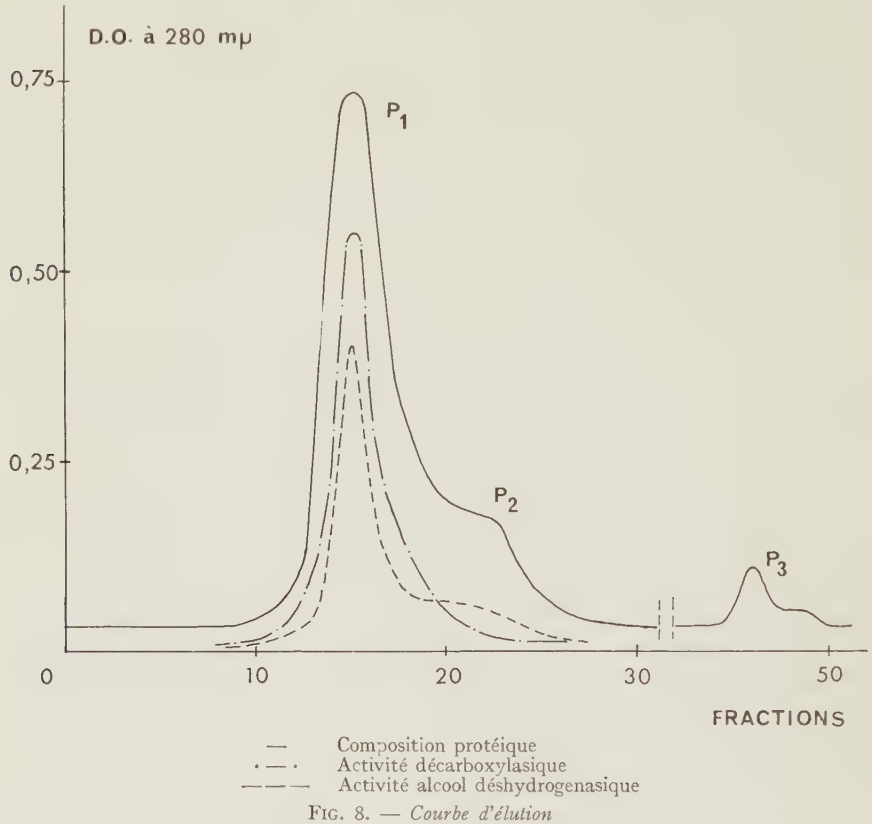


FIG. 8. — *Courbe d'élution*

On constate encore que l'influence des prémélanoïdines va en diminuant jusqu'à s'annuler au fur et à mesure que progresse la purification. Nous avons tenté d'étayer cette hypothèse de l'existence éventuelle d'inhibiteurs protéiques qui accompagneraient normalement l'enzyme, et dont l'action serait annihilée par la présence de prémélanoïdines ; nous avons cherché à voir si en introduisant chacun des pics secondaires dans le milieu de réaction contenant le substrat et le pic de la décarboxylase, l'activité de cette dernière se trouverait modifiée ; de plus, nous avons voulu préciser si, dans ces conditions, les prémélanoïdines retrouveraient une certaine activité sur l'action décarboxylasique. Les essais réalisés peuvent être schématisés comme suit :

I Milieu de réaction + P_1 + P_2 + Prémélanoïdines
II Milieu de réaction + P_1 + P_2 + Témoin *glc* — *gly*
III Milieu de réaction + P_1 + P_3 + Prémélanoïdines
IV Milieu de réaction + P_1 + P_3 + Témoin *glc* — *gly*

Les résultats de ces essais ont été complètement négatifs : l'activité de P_1 n'est en rien modifiée par l'addition de P_2 ou de P_3 et naturellement, l'influence des prémélanoïdines s'est avérée nulle.

Bien que ces effets paraissent infirmer notre hypothèse au stade de l'extrait IIb_1, elle pourrait rester valable du moins en partie, dans le cas de l'extrait initial A. Mais on ne peut encore exclure *a priori* l'hypothèse selon laquelle surviendrait, au cours de la purification, une modification de la surface active de l'enzyme empêchant une fixation de composés jouant le rôle d'inhibiteurs. Il est vrai que jusqu'ici nous n'avons considéré que l'action anti-inhibitrice des prémélanoïdines, mais l'hypothèse selon laquelle ils joueraient le rôle d'activateurs n'est pas à écarter ; dans l'état actuel des puretés de la décarboxylase, ceci reste une hypothèse puisque nous ne disposons d'aucun fait expérimental pour le démontrer.

2° **La lactate déshydrogénase** (E. C. : 1. 1. 2. 3)

a) *Préparation*

A 50 g de levure de boulangerie lavée plusieurs fois à l'eau distillée, on ajoute 100 ml de tampon phosphate M/15, pH = 7,2. Après centrifugation, on sépare le culot et on rejette le surnageant. Le dépôt obtenu est remis en suspension dans 100 ml de même tampon. On ajoute à cette solution 50 g de sable de quartz très fin (lavé à l'acide chlorhydrique 6 N et calciné à 900°C pendant 5 h). On effectue ensuite un broyage à l'Ultra-Turrax (Janke-Kunnel) à 20 000 tours/mn pendant 10 mn. Toutes ces opérations sont conduites à basse température. Par centrifugation, on élimine le culot et on garde le surnageant (L) auquel on ajoute 20 ml d'acétate de calcium (1 M) ; il se forme un précipité abondant que l'on sépare par centrifugation. On garde le surnageant que l'on amène à pH = 7,2 avec une soude 6 N. On ajoute à cette solution du sulfate d'ammonium jusqu'à l'obtention d'un degré de saturation de 39 p. 100. Après centrifugation, on élimine le précipité et on amène le surnageant à 60 p. 100 de saturation en sulfate d'ammonium. On centrifuge et, dans le précipité (M) obtenu, se trouve concentrée la lactate déshydrogénase.

b) *Dosage de l'activité*

L'activité de la lactate déshydrogénase est mesurée par la vitesse de réduction du ferricyanure de potassium, dont l'évolution est suivie à 420 mμ ; l'extrait enzymatique est suffisamment dilué pour que l'enzyme soit le facteur limitant de la réaction. Nous avons suivi pour l'essentiel les conditions d'expérience indiquées par Barré et Galzy (67) :

0,2 ml de ferricyanure de potassium 10^{-2} M
0,2 ml de lactate de sodium 10 p. 100 L (+) (Sigma)
2 ml de tampon phosphate M/15, pH = 7,2
0,2 ml d'extrait enzymatique
1 ml de prémélanoïdines ou de témoin.

c) *Action des prémélanoïdines*

Nous avons étudié l'action des prémélanoïdines de 2 h, 8 h, sans dilution, et celles de 24 h. et de 48 h. à la dilution 100, sur l'activité lactico-déshydrogénase.

Comme dans le cas de l'alcool déshydrogénase, l'influence des prémélanoïdines sur la lactate déshydrogénase s'est révélée nulle aux deux stades extrêmes de la purification de l'enzyme (extraits L et M).

Discussion.

1° En ce qui concerne la fermentation alcoolique, une influence des prémélanoïdines sur la lactate déshydrogénase, pour importante qu'elle ait pu être, n'aurait pas suffi à expliquer les phénomènes observés *in vivo*, en raison des très faibles quantités d'acide lactique produites au cours de la fermentation alcoolique.

2° Dans la mesure où l'on peut assimiler lactates déshydrogénases bactériennes et lactates déshydrogénases de la levure, une influence des prémélanoïdines ne peut pas même expliquer les faibles influences constatées *in vivo*. Il ne semble pas que l'on puisse expliquer de cette façon l'action minime des prémélanoïdines sur les ferments lactiques.

3° **La pyruvate décarboxylase oxydative** (E C. : 1. 2. 2. 2)

a) *Préparation*

Nous en avons entrepris l'isolement à partir de mycélium d'*Aspergillus wentii*, obtenu après 4 jours d'incubation sur le milieu de base au saccharose.

Nous avons utilisé pour l'essentiel, le même mode opératoire que celui décrit par Ramakrishnan (44) : cet auteur a utilisé, en la modifiant très légèrement, la technique de Sanadi et Littlefield (68) employée par ces derniers pour la purification de l'α-cétoglutarate décarboxylase oxydative, isolée de cœur de porc : le mycélium est lavé plusieurs fois à l'eau distillée froide (2°C), puis, essoré sur verre fritté n° 2 ; à 10 g de mycélium, on ajoute 30 ml de tampon phosphate froid 0,02 M, pH = 7,2 et 10 g de sable de quartz très fin, traité comme il a été décrit précédemment (Cf. lactate déshydrogénase) ; on broie ensuite à l'Ultra-Turrax (Janke-Kunel) à 20 000 tours/minute, pendant 10 mn ; le broyeur est arrêté toutes les 2 mn pour éviter l'échauffement. Toutes les opérations doivent être conduites sous basse température (3°C), le refroidissement étant effectué à l'aide d'un bac à glace. On obtient une suspension homogène, très fine. Par centrifugation, à 3 000 t/mn pendant 20 mn, le culot obtenu est éliminé, et le surnageant restant (P) est ajusté à pH = 5,4, avec de l'acide acétique à 10 p. 100. Un trouble léger se forme. On effectue une centrifugation plus poussée à 5 000 t/mn pendant 20 mn. On rejette le surnageant et on garde le précipité que l'on reprend avec 15 ml d'eau distillée ; on ajuste le pH de cette solution à 7,2 avec de la soude 6 N, et on la soumet alternativement pendant trois cycles successifs, à une congélation et fusion ; une certaine quantité de protéines sont ainsi coagulées ; par centrifugation, à 5 000 t/mn pendant 20 mn, on aboutit à un surnageant clair (Q) où se trouve notamment localisée la pyruvate décarboxylase oxydative.

b) *Méthode de dosage*

L'activité de l'enzyme est mesurée par la réduction du 2-6-dichlorophénol-indophénol qui accompagne l'oxydation du pyruvate en acétate. On suit l'évolution du premier à 600 mμ.

Les conditions d'expérience ont été les mêmes que celles de RAMAKRISHNAN (44) : Dans la cuve du spectrophotomètre, on met :

— 0,5 ml d'extrait enzymatique,
— 0,2 ml de thiamine pyrophosphate (TPP) (Sigma), 10 mg/10 ml d'eau distillée,
— 0,1 ml de Cl_2Mg 0,2 M,
— 1 ml de tampon phosphate 0,02 M, pH = 7,2,
— 0,1 ml de 2-6-dichlorophénol-indophénol à 0,11 p. 100,
— 0,2 ml de pyruvate de potassium 0,5 M,
— 1 ml de prémélanoïdines ou de témoin.

c) *Action des prémélanoïdines*

Nous avons étudié le comportement de deux extraits (P) et (Q), en présence des prémélanoïdines 2 h et 8 h sans dilution, et des prémélanoïdines 24 h et 48 h diluées 100 fois.

Les tableaux 38 et 39 représentent les résultats obtenus, donnés par les valeurs du rapport $\frac{V}{V_T}$, où V est la vitesse de réduction du 2-6-dichlorophénol-indophénol, en présence de prémélanoïdines, et V_T la vitesse du témoin.

On voit que les prémélanoïdines sont nettement activatrices et que, là encore, l'activité semble diminuer au fur et à mesure que progresse la purification.

TABLEAU 38

Extrait P

Prémélanoïdines de	2 h	8 h	24 h	48 h
Dilutions	1	1	100	100
$\frac{V}{V_T}$	1,30	1,35	1,15	1,20

TABLEAU 39

Extrait Q

Prémélanoïdines de	2 h	8 h	24 h	48 h
Dilutions	1	1	100	100
$\frac{V}{V_T}$	1,20	1,22	1,10	1,13

Conclusion

En résumé, les limites d'action des préparations de prémélanoïdines sur l'activité enzymatique *in vitro* de la pyruvate décarboxylase et de la pyruvate décarboxylase oxydative ont été précisées. L'explication la plus simple que nous avons été en mesure de vérifier serait qu'elles jouent un rôle d'anti-inhibiteurs, vis-à-vis de substances accompagnant l'enzyme, puisque, comme nous l'avons noté, leur action diminue au fur et à mesure que la purification de l'extrait est poussée.

Il semblerait aussi que ces prémélanoïdines, au moins au niveau du pyruvate, agissent spécifiquement sur les systèmes décarboxylasiques puisqu'aucune action n'a été relevée sur l'alcool déshydrogénase ni sur la lactate déshydrogénase.

De toutes façons, il ne semble pas que la décarboxylase des levures et celle des ferments citriques soient le système enzymatique le plus directement responsable des effets constatés *in vivo*, par action des prémélanoïdines sur la fermentation alcoolique et citrique ; alors que nous avions observé une activation maximum, d'une part de la décarboxylation pour les levures, d'autre part de la formation d'acide citrique pour les ferments citriques, à très faibles concentrations de prémélanoïdines dans le milieu de fermentation, nous ne retrouvons pas ce phénomène avec les deux décarboxylases ; l'activation va en diminuant avec la concentration des effecteurs.

RÉSUMÉ

L'objet de ce travail fait suite à celui de Sheikh et coll. qui ont étudié l'influence des prémélanoïdines sur la fermentation alcoolique et le développement de la levure.

Dans une *première partie*, nous avons examiné comment réagissaient aux produits de la réaction de Maillard — résultant du chauffage d'une solution de glucose et de glycocolle — des microorganismes tels que les ferments lactiques et citriques, soit du point de vue de leur métabolisme, soit du point de vue de leur développement. Les résultats des observations varient avec le type de microorganisme étudié ; de plus, pour un même type de microorganisme, le résultat de la présence des prémélanoïdines se traduit par des effets parfois opposés ; souche utilisée, composition de milieu de culture, type et concentration des prémélanoïdines, sont autant de facteurs qui influent sur le sens et l'intensité de la réponse du microorganisme.

Avec les ferments lactiques, dont trois souches homofermentatives ont été examinées, la présence de prémélanoïdines se manifeste par des variations de vitesse de croissance ou de production d'acide lactique. Les très faibles doses de prémélanoïdines ont une action faible ou nulle.

Avec les deux souches de ferments citriques étudiées, on a observé par addition de prémélanoïdines un effet sensible, d'une part, sur la vitesse de production d'acide et de mycélium, d'autre part, sur la production globale de ces deux éléments. De plus, il nous a paru remarquable de retrouver, dans le cas de ces moisissures, une influence des prémélanoïdines, à très faibles doses, semblable à celle rapportée par Sheikh sur les levures.

L'ensemble de ces résultats, joints à ceux de Sheikh, conduit à admettre que les produits de la réaction de Maillard exercent un effet, soit activateur soit inhibiteur, sur le métabolisme de microorganismes tels que la levure, les moisissures et les bactéries.

Dans la *deuxième partie* de notre travail, nous avons essayé de chercher une explication à ces phénomènes observés *in vivo*, et nous avons pour cela tenté de préciser l'action de ces mêmes produits sur des réactions enzymatiques, observées *in vitro*, après extraction des enzymes à partir de microorganismes.

Tandis que l'action des prémélanoïdines s'est révélée nulle, à tous les stades de purification, sur l'alcool déshydrogénase et la lactate déshydrogénase, une action nettement activatrice a été observée chez deux enzymes responsables de la décarboxylation : la pyruvate décarboxylase et la pyruvate décarboxylase oxydative.

Cette influence est, d'une part, d'autant plus forte que le temps de chauffage des préparations est plus long, et d'autre part, d'autant plus faible que les extraits enzymatiques sont plus purifiés.

L'explication la plus simple de ces observations est que les prémélanoïdines exerceraient une action antagoniste vis-à-vis d'inhibiteurs accompagnant les deux enzymes dans leur milieu naturel. Cette action n'est certainement pas la seule à mettre en cause : l'hypothèse selon laquelle les prémélanoïdines joueraient un rôle propre d'activateurs n'est pas à exclure. On doit alors admettre qu'elles perdent cette propriété à la suite d'une modification de l'enzyme, au cours de la purification de l'extrait enzymatique.

SUMMARY

This work follows up SHEIKH and collaborators study of the effect of premelanoïdins on alcoholic fermentation and yeast growth.

In the first part, we have studied the behaviour of microorganisms such as lactic and citric ferments when coming into contact with Maillard reaction products — resulting from heating a solution of glucose and glycine — either on the point of view of their metabolism, or on the point of view of their development.

The results from observations vary as the microorganism type studied ; moreover, for microorganisms of one same type, the premelanoïdins presence results sometimes into opposite effects : strain used, culture medium composition premelanoïdins type and concentration, are so many factors to affect the direction and intensity of the microorganism response.

To regards lactic ferments, three homofermentative strains of which have been examined, the presence of premelanoïdins brings about variations in growth rate or lactic acid production. The very low premelanoïdins doses have a weak or non existent effect.

With both citric ferments strains as studied, we observed when adding premelanoïdins a noticeable effect, on one hand, on the acid and mycelium rate of production, on the other hand on the total production of these two factors. Moreover, our attention has been drawn to the fact that in the case of these moulds, premelanoïdins in very small quantities are found again to have some influence, same as the one on yeasts related by SHEIKH.

The results as a whole, together with SHEIKH's lead to admit that the Maillard reaction products have an action, either an enhancing or an inhibiting one, on the metabolism of microorganisms such as yeast, molds and bacteria.

In the second part of our work, we have tried to account for these phenomena studied *in vivo*, and therefore we have endeavoured to state more precisely the action of these same products on enzymatic reactions as observed *in vitro*, after extracting enzymes out of the microorganisms.

Whereas the action of premelanoïdins proved non-existent at every stage of purification, on alcohol dehydrogenase and lactate dehydrogenase, two decarboxylation enzymes have been noted to show a clearly activating influence : pyruvate decarboxylase, and pyruvate decarboxylase oxydative.

This influence is, on one hand, all the stronger as the heating period of preparations is longer, and on the other hand, all the slighter as the enzymatic extracts are more purified.

The simpler way to account for these observations is to assume that premelanoïdins exert an antagonistic influence on inhibitors which attend on both enzymes in their natural medium. This action is certainly not the only one to be implied : the hypothesis according to which the premelanoïdins might play their own activating part is not to be thrown up. It must then be assumed that they lose this property once the enzyme has altered during the purification of the enzymatic extract.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

(1) MAILLARD L. C., 1912. Action des acides aminés sur les sucres : formation des mélanoïdines par voie méthodique. *C. R. Acad. Sci.*, **154**, 66-68.

(2) ENDERS C., 1938. Zur Kenntnis der Melanoidine. *Kolloïd Z.*, **85**, 74-87.

(3) STADTMAN E. R., 1948. Non enzymatic browning in fruit products. *Adv. Food Res.*, **1**, 325-372.

(4) DANEHY J. P., PIGMAN W. W., 1951. Reactions between sugars and nitrogenous compounds and their relationship to certain food problems. *Adv. Food Res.*, **3**, 241-290.

(5) HODGE J. E., 1953. Chemistry of browning reactions in model systems. *Agric. Food Chem.*, **1**, 928-943.

(6) ELLIS G. P., 1959. The MAILLARD reaction. *Adv. Carb. Chem.*, **14**, 63-136.

(7) REYNOLDS T. M., 1963. Chemistry of non enzymatic browning. I. The reaction between aldoses and amines. *Adv. Food Res.*, **12**, 1-52.

(8) CHICHESTER C. O., STADTMAN F. H., Mc KINNEY G., 1952. On the products of the MAILLARD reaction. *J. Amer. Chem. Soc.*, **74**, 3418-3420.

(9) SCHÖNBERG A., MOUBACHER R., 1952. The Strecker degradation of α-amino acids. *Chem. Rev.*, **50**, 261-277.

(10) PATTON A. R., HILL E. G., FOREMAN E. M., 1948 *b*. Amino acid impairment in casein heated with glucose. *Science*, **107**, 623.

(11) PATTON A. R., HILL E. G., FOREMAN E. M., 1948 *b*. The effect of browning on the essential amino acid content of soy globulin. *Science*, **108**, 659.

(12) MENDEN E., CREMER H. D., 1956. Über nicht enzymatische Bräunungsreaktionen und ihre physiologischen Folgen. *Z. Lebensm. Unters, Forsch*, **104**, 33-43.

(13) SHEIKH N. M., GODON B., PETIT L., 1961. Influence des produits de la réaction de MAILLARD sur la fermentation alcoolique et le développement de la levure. *Ann. Technol. agric.*, **10**, 1, 5-42.

(14) HUGGETT A. St. G. NIXON D. A., 1957. Enzymatic determination of blood glucose. *Biochem. J.*, **66**, 12 p.

(15) SHAEFFER P. A., HARTMANN A. F., 1920-1921. The iodometric determination of copper and its use in sugars analysis II. Methods for determination of reducing sugars in blood, wine, milk and other solutions. *J. Biol. Chem.*, **45**, 365-390.

(16) THOMPSON J. F., ZACHARIUS P. M, STEWARD F. C., 1951. Investigations on nitrogen compounds and nitrogen metabolism in plants. I. The reactions of nitrogen compounds with ninhydrin on paper : a quantitative procedure.

(17) STARON T., ALLARD C., CHAMBRE M. M., 1961. Nouvelle méthode de chromatographie sur papier et de dosage des acides aminés. *C. R. Acad. Sci.*, **253**, 1630-1632.

(18) PETIT L., 1959. Recherches sur la réaction de MAILLARD. *Ann. Technol. agric*, **1**, 5-23.

(19) ORLA JENSEN A. D., 1933. Hitherto unknown activators for the growth of lactic acid bacteria. *J. Soc. Chem. Ind.*, **52**, 374 T-379 T.

(20) RABINOWITZ J. C., SNELL E. E., 1947. The Vitamin B_6 group. XI. An improved method for assay of vitamin B_6 with *Str .faecalis*. *J. Biol. Chem.*, **169**, 631-642.

(21) SMILEY K. L., NIVEN C. F., SHERMAN J. R., SHERMAN J. M., 1943. The nutrition of *Str. salivarius*. *J. Bacteriol*, **45**, 445-454.

(22) ROSE C. S., FELDBAUM E. P., NORRIS R. F., GYÖRGY P., 1952. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **81**, 709.

(23) ROSE D., PETERSON R., 1949. Influence of the amino acid — Dextrose reaction on growth of lactic acid bacteria. *Canad. J. Res.*, **27**, Sect. B, 428-436.

(24) ROGERS D., KING T. E., CHELDELIN V. H., 1953. Growth stimulation of *Lactobacillus gayoni* by N-D glucosylglycine. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **82**, 140-144.

(25) CHELDELIN V. H., KING T. E., 1953. Nutrition of microorganisms. *Ann. Rev. Microb.*, **7**, 113.

(26) RAMSEY H. H., LANKFORD L. E., 1956. Stimulation of growth initiation by heat degradation product of glucose. *J. Bacteriol.*, **72**, 511-518.

(27) AUCLAIR J. E., PORTMANN E., 1958. Effet stimulant du lait autoclavé sur la croissance de *L. lactis*. *Ann. Technol. agric.*, **2**, 129-150.

(28) Foster E. M., 1952. The effect of heat on milk as a culture medium for lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.*, **35**, 988-997.

(29) Parker R. B., Elliker P. R., 1954. Effect of heat treatment of milk on subsequent activity of starter culture. *Proc. W. Div. Amer. Sci. Ass.*, 361-365.

(30) Patton A. R., Hill E. G., 1948 *a*. Inactivation of nutrients by heating with glucose. *Science*, **107**, 68.

(31) Mc Allister R. A., 1954. The inactivation of certain nutrients in culture media by heating with glucose and its relation to the growth of certain lactobacilli. *J. Med. Lab. Technol.*, **12**, 74-79.

(32) Lankford C. E., Ravel J. M., Ramsey H. H., 1957. The effect of glucose and heat sterilization on bacterial assimilation of cystine. *Appl. Microbiol.*, **5**, 65-69.

(33) Auclair J. E., 1953. *Studies on the antibacterial properties of cow's milk.* Ph. D. Thesis, University of Reading, 1953.

(34) Auclair J. E., Portmann E., 1956. *Influence du chauffage du lait aux températures de pasteurisation et de stérilisation sur la croissance des bactéries lactiques.* 14e Congrès International. Laiterie, Rome Vol., **1**, Partie 2, 17-30.

(35) Finkelstein R. A., Lankford C. E., 1957. A bacteriotoxic substance in autoclaved culture media containing glucose and phosphate. *Appl. Microbiol.*, **5**, 74-79.

(36) Sharpe M. E., 1961. Taxinomie des *Lactobacillus*. *Ann. Inst. Pasteur*, Lille, **12**, 1-16.

(37) Snell E. E., Wright L. D., 1941. *J. Biol. Chem.*, **139**, 675.

(38) Monod J., 1942. *Recherches sur la croissance de cultures bactériennes*. Thèse.

(39) Johnson B. C., 1948. *Methods of vitamin determination.* Burgess Publ. Edit., **426**, South 6th Street, Minneapolis.

(40) Wehmer C., 1893. Note sur la fermentation citrique. *Bull. Soc. Chim.*, **9**, 728-730.

(41) Wehmer C., 1893. Préparation d'acide citrique de synthèse, par la fermentation du glucose. *C. R. Acad. Sci.*, **117**, 332.

(42) Lewis K. F., Weinhouse S., 1951. Studies on mecanism of citric acid production in *Aspergillus niger*. *J. Amer. Chem. Soc.*, **73**, 2500-2503.

(43) Martin S. M., 1954. The succinoxidase system in *Aspergillus niger*. *Canad. J. Microbiol.*, **1**, 6-11.

(44) Ramakrishnan C. V., 1954. The tricarboxylic acid cycle in *Aspergillus niger*. *Enzymologia*, **17**, 3, 169-174.

(45) Ramakrishnan C. V., Steel R., Lentz C. P., 1955. Mechanism of citric acid formation and accumulation in *Aspergillus niger*. *Arch. Biochem. and Biophys.*, **55**, 270-273.

(46) Cochrane V. W., 1958. *Physiology of fungi*. New York, John Willey and Sons. Inc., 138.

(47) Currie J. N., 1917. The citric acid fermentation of *Aspergillus niger*. *J. Biol. Chem.*, **31**, 15-37

(48) Doelger W. P., Prescott S. C., 1934. Citric acid fermentation. *Ind. Eng. Chem.*, **26**, 1142-1149.

(49) Shu P., Johnson M. J., 1948. Citric acid production by submerged fermentation with *Aspergillus niger*. *Industr. Engng. Chem.*, **40** (7), 1202-1205.

(50) Perlman D., 1946. *Arch. Biochem.*, **11**, 123.

(51) Bertrand D., de Wolf A., 1962. Influence du fer et du manganèse comme oligo-éléments sur la synthèse de l'aconitase chez *Aspergillus niger*. *C. R. Acad. Sci.*, **254**, 4381-4383.

(52) Quilico A., Dicapua E. A., 1932. Sopra l'influenza del ferro sulla fermentazione citrica dell' *Aspergillus niger*. *Chim. et Industria* (Milan), **14**, 289.

(53) Perlman D., Dorrel W. W., Johnson M. J., 1946. Effect of metallic ions on the production of citric acid by *Aspergillus niger*. *Arch. Biochem.*, **10**, (3), 131-134.

(54) Steinberg R. A., Bowling J. D., 1939. *J. Agric. Res.*, **58**, 717-732.

(55) Perlman D., Kita D. A., Peterson W. H., 1946. Production of citric acid from cane molasses. *Arch. Biochem.*, **11**, (L°), 123-129.

(56) Roberts O., Murphy D., 1944. A rapid fermentation method for a production of calcium citrate and calcium gluconate from beet molasses. *Sci. Proc. Roy. Dublin Soc.*, **23**, 307-314.

(57) Gerhardt P., Dorrell W. W., Boldwin I. L., 1946. Citric acid fermentation of beet molasses. *J. Bacteriol.*, **52**, (5), 555-564.

(58) Clark D. S., 1962. *Submerged citric acid fermentation of sugar beet molasses*. I and E. C. Product. Res. and Devel., 1, 59-62.

(59) Malo J. L., Regueiro B., 1957. Estudios sobre produccion de acido citrico por fermentacion. *Microbiologia Española*, **10**, (4), 425-450.

(60) Cheftel R. I., Munier R., Machebœuf M., 1951. Microchromatographie de partage sur papier des acides aliphatiques hydro-solubles et non volatils. *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **33**, (7), 840-845.

(61) Bove J., Raveux R., 1957. La séparation et la détermination des acides carboxyliques de C_1 à C_6 par chromatographie de partage sur colonne de silice. *Bull. Soc. Chim. Fr.*, 368-381.

(62) Bryant F., Overell B. T., 1953. *Biochem. Biophys. Acta*, **10**, 471-476.

(63) Green D. E., Herbert D., Subrahmanyan V., 1940. Carboxylase. *J. Biol. Chem.*, **133**, 327-339.

(64) Henri V., 1903. *Lois générales de l'action des diastases*. Thèse de Sciences, Paris.

(65) Michaelis L., Menten M. L., 1913. *Biochem.*, **2**, **49**, 333.
(66) Lineweaver H., Burk D., 1934. *J. Amer. Chem. Soc.*, **56**, 658.
(67) Barré P., Galzy P., 1962. Étude d'un lactobacille homofermentatif isolé du vin. *Ann. Technol. agric.*, **11**, (2), 121-130.
(68) Sanadi D. R., Littlefield J. W., Bock R. M., 1952. Studies on α-Ketoglutaric oxidase. *J. Biol. Chem.*, **197**, 831-862.

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

« SYNTHÈSE ET DÉGRADATION ENZYMATIQUES DE L'AMIDON. »

VU ET APPROUVÉ :

Paris, le 8 octobre 1965

Le Doyen de la Faculté des Sciences

Marc ZAMANSKY

VU ET PERMIS D'IMPRIMER :

Le Recteur de l'Académie de Paris,

Jean ROCHE

Imprimerie Bussière à Saint-Amand (Cher), France. — 3-1966.

Dépôt légal: 1er trimestre 1966. N° d'impression: 1922.